

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

ANNÉE 1936

THÈSE

N^o 616

POUR

LE DOCTORAT EN MÉDECINE

(DIPLOME D'ÉTAT)

PAR

Samuel SEYDEL

Né le 4 avril 1900, à Genève (Suisse)
Ancien externe des Hôpitaux de Paris
Licencié ès Sciences

DU FONDEMENT BIOLOGIQUE

ET

DU MÉCANISME DE LA RÉACTION
DE BORDET-WASSERMANN

LA PRATIQUE STANDARDISÉE DU SÉRO-DIAGNOSTIC
DE LA SYPHILIS

Président : M. ROBERT DEBRÉ, Professeur

PARIS

IMPRIMERIE DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE

JOUVE & C^{ie}, ÉDITEURS

15, RUE RACINE, 15

1936

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

ANNÉE 1936

THÈSE

N°

POUR

LE DOCTORAT EN MÉDECINE

(DIPLOME D'ÉTAT)

PAR

Samuel SEYDEL

Né le 4 avril 1900, à Genève (Suisse)
Ancien externe des Hôpitaux de Paris
Licencié ès Sciences

DU FONDEMENT BIOLOGIQUE

ET

DU MÉCANISME DE LA RÉACTION
DE BORDET-WASSERMANN

LA PRATIQUE STANDARDISÉE DU SÉRO-DIAGNOSTIC
DE LA SYPHILIS

Président : M. ROBERT DEBRÉ, Professeur

PARIS

IMPRIMERIE DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE

JOUVE & C^{te}, ÉDITEURS

15, RUE RACINE, 15

1936

I. — PROFESSEURS

	MM.
Anatomie	ROUVIÈRE.
Physiologie	Léon BINET.
Physique médicale	STROHL.
Chimie médicale	DESGREZ.
Bactériologie	R. DEBRÉ.
Parasitologie et histoire naturelle médicale	BRUMPT.
Pathologie et thérapeutique générales	BAUDOUIN.
Pathologie chirurgicale	CHEVASSU.
Anatomie pathologique	ROUSSY.
Histologie	CHAMPY.
Pharmacologie et matière médicale	TIFFENEAU.
Thérapeutique	HARVIER.
Hygiène et médecine préventive	TANON.
Médecine légale	BALTHAZARD.
Histoire de la médecine et de la chirurgie	LAIGNEL-LAVASTINE.
Pathologie expérimentale et comparée	FIESSINGER.
Hydrologie thérapeutique et climatologie	Maurice VILLARET.
	LOEPER.
Clinique médicale	CARNOT.
	CLERC.
	Marcel LABBÉ.
Hygiène et clinique de la première enfance	LEREBOULLET.
Clinique des maladies des enfants	NOBÉCOURT.
Clinique des maladies mentales et des maladies de l'encéphale.	H. CLAUDE.
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques	GOUGEROT.
Clinique des maladies du système nerveux	GUILLAIN.
Clinique des maladies infectieuses	LEMIERRE.
	CUNÉO.
Clinique chirurgicale	GOSSET.
	GRÉGOIRE.
	LENORMANT.
Clinique ophtalmologique	TERRIEN.
Clinique urologique	MARION.
	BRINDEAU.
Clinique d'accouchements	COUVELAIRE.
	JEANNIN.
Clinique gynécologique	MOCQUOT.
Clinique chirurgicale infantile et orthopédie	OMBRÉDANNE.
Clinique thérapeutique médicale	RATHERY.
Clinique oto-rhino-laryngologique	LEMAITRE.
Clinique thérapeutique chirurgicale	Pierre DUVAL.
Clinique propédeutique	SERGEANT.
Clinique de la tuberculose	BEZANÇON.
Clinique chirurgicale orthopédique de l'adulte	MATHIEU.
	HOVELACQUE.
Professeurs sans chaire	MULON.
	OLIVIER.
	VERNE.

II. — AGRÉGÉS EN EXERCICE

MM.

BÉNARD (H.) .. Pathologie médicale.
 BERNARD (E.).. Pathologie médicale.
 BOULIN Pathologie médicale.
 BULLIARD Histologie.
 CATHALA Pathologie médicale.
 CHEVALLIER .. Pathologie médicale.
 DOGNON Physique.
 FEY Urologie.
 GALLIARD Parasitologie.
 GASTINEL Bactériologie.
 DE GAUDART D'ALLAINES.. Pathologie
 chirurgicale.
 GAYET Physiologie.
 GIROUD Histologie.
 HAGUENAU ... Pathologie médicale.
 HALPHEN Oto-rhino-laryngologie.
 HAZARD Pharmacologie.
 HUGUENIN Anatomie pathologique.
 JOANNON Hygiène.
 LABBÉ (Henri).. Chimie biologique.
 LACOMME Obstétrique.

MM.

LANTUÉJOUL .. Obstétrique.
 LAROCHE (G.).. Pathologie médicale.
 LEMAIRE Pathologie expérimentale.
 LEVEUF Pathologie chirurgicale.
 M^{lle} J. LÉVY.... Pharmacologie.
 LÉVY-VALENSI. Neurologie et Psychiatrie.
 MOREAU Pathologie médicale.
 MOULONGUET.. Pathologie chirurgicale.
 MOUQUIN Pathologie médicale.
 OBERLING Anatomie pathologique.
 PETIT-DUTAILLIS. Pathologie chirurgicale.
 PIÉDELIEVRE .. Médecine légale.
 PORTES Obstétrique.
 RICHT Physiologie.
 SANNIÉ Chimie biologique.
 SÈNÈQUE Pathologie chirurgicale.
 TROISIER Pathologie expérimentale.
 TURPIN Pathologie médicale.
 VIGNES Obstétrique.
 WILMOTH Pathologie chirurgicale.
 Justin BESANÇON. Hydrologie.

III. — AGRÉGÉS RAPPELÉS A L'EXERCICE

POUR LE SERVICE DES EXAMENS

MM.

ALGLAVE Pathologie chirurgicale.
 BUSQUET Pharmacologie.
 CHAILLEY-BERT.. Physiologie.

MM.

LEROUX Anatomie pathologique.
 NEVEU-LEMAIRE. Parasitologie.

IV. — AGRÉGÉS CHARGÉS DE COURS DE CLINIQUE ANNEXE

A TITRE PERMANENT

MM.		MM.	
ABRAMI.	Clinique médicale.	BASSET.	Clinique chirurgicale.
ALAJOUANINE.		BROCQ.	
AUBERTIN.		CADENAT.	
BRULÉ.		GATELLIER.	
CHABROL.		HEITZ-BOYER.	
CHIRAY.		MOURE.	
DONZELOT.		QUÉNU.	
DUVOIR.		SCHWARTZ.	
LIAN.		VELTER.	
VALLERY-RADOT			
(Pasteur).			
SÉZARY.			
MM.			
ÉCALLE.	Clinique obstétricale.		
GUÉNIOT.			
LE LORIER.			
LÉVY-SOLAL.			
METZGER.			

V. — CHARGÉS DE COURS

MM.	
CHAILLEY-BERT, agrégé ...	Éducation physiqu
LEDOUX-LEBARD	Radiologie clinique.
WEIL-HALLÉ	Puériculture.
N... ..	Stomatologie.

Par délibération en date du 9 décembre 1798, l'Ecole a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

A LA MÉMOIRE DE NOS PREMIERS MAÎTRES DE STAGE

MM. LES PROFESSEURS GILBERT ET LEJARS

Le prestigieux enseignement de la Clinique Médicale de l'Hôtel-Dieu, les inoubliables leçons de métier de la Chaire Magistrale de l'Hôpital Saint-Antoine, nous ont inculqué, avec les éléments de base de notre formation clinique, les principes d'une haute tradition médicale.

A NOTRE PRÉSIDENT DE THÈSE

M. LE PROFESSEUR ROBERT DEBRÉ

Professeur à la Faculté de Médecine
Médecin de l'Hôpital Hérold
Chevalier de la Légion d'honneur

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre Jury de Doctorat.

En hommage de très respectueuse gratitude.

A M. LE DOCTEUR V. CATHALA

Accoucheur honoraire des Hôpitaux
Chevalier de la Légion d'honneur

Qui a bien voulu nous confier, durant quatre années, la direction du Laboratoire de la Maternité de l'Hôpital Saint-Louis, nous donnant ainsi la possibilité d'acquérir de précieuses connaissances et de poursuivre des recherches personnelles.

Que notre Maître veuille bien trouver ici l'expression de notre très respectueuse et profonde reconnaissance.

A NOS PROFESSEURS DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE

A NOS MAÎTRES DANS LES HOPITAUX

M. LE PROFESSEUR TEISSIER (*in memoriam*)

M. LE PROFESSEUR PROUST (*in memoriam*)

M. LE PROFESSEUR AGRÉGÉ A. LÉRI (*in memoriam*)

M. LE PROFESSEUR AGRÉGÉ AUBERTIN

M. LE PROFESSEUR AGRÉGÉ PASTEUR VALLERY-RADOT

M. LE PROFESSEUR AGRÉGÉ HEITZ-BOYER

M. LE DOCTEUR MOURE

M. LE DOCTEUR RIST

M. LE DOCTEUR CATHALA

A NOS CONFÉRENCIERS, A NOS COLLÈGUES
ET CONDISCIPLES

DU FONDAMENT BIOLOGIQUE ET DU MÉCANISME DE LA RÉACTION DE BORDET-WASSERMANN

AVANT-PROPOS

« Les manipulations sérologiques sont des opérations de chimie physique dans lesquelles le moindre détail a son importance. »

DEBAINS.

Le présent travail est une simple introduction à l'étude rationnelle de la réaction de Bordet-Wassermann, et un essai sur la standardisation technique qui doit logiquement en découler.

La sérologie joue actuellement un rôle de premier plan dans la pratique médicale courante.

Qu'il s'agisse de corroborer quelque présomption clinique, d'éclairer une étiologie imprécise ou d'apporter la preuve d'une infection syphilitique latente, le recours au séro-diagnostic apparaît réellement indispensable.

Du point de vue particulier de la médecine sociale, la réaction de Wassermann constitue un moyen de dépistage de la syphilis dont il serait vain de souligner l'efficacité prophylactique, et elle peut être considérée, à juste titre, comme l'une des plus puissantes parmi les armes dont dispose le médecin dans la lutte antivénérienne.

« La syphilis, écrit Milian (1), est latente pendant la majeure partie de son évolution.

« Tandis qu'au début ses manifestations sont nombreuses et

1. Milian, in *Nouvelle Pratique dermatologique*, t. II, Masson, 1936.

presque permanentes (chancre, plaques muqueuses, syphili-
des papuleuses, paralysie des nerfs crâniens), celles-ci s'étei-
gnent peu à peu *et la maladie reste muette, sans cependant être
morte*, comme en témoignent ses réveils subits à des époques
souvent très éloignées du début.

« Il est usuel de voir un syphilitique présenter cinq, dix,
quinze, vingt ans après le chancre, et alors même qu'il parais-
sait guéri, c'est-à-dire dépourvu de toute manifestation objec-
tive, une gomme cutanée, une hépatite, une hémiplegie.

« Chez la femme, le problème de la syphilis latente et, en
particulier, son dépistage, constitue l'une des difficultés les
plus grandes de la pratique du syphiligraphe, comme aussi
l'une des plus importantes au point de vue social. »

« Chez l'homme, la syphilis latente présente un autre in-
térêt : à la faveur de cette latence qui, établie spontanément
ou après un traitement intensif, donne sécurité et confiance,
l'homme a des rapports sexuels et il contamine. Il contamine
d'autant plus dangereusement que la contamination est fruste,
qu'il n'y a pas de chancre, que la femme n'a pas d'accidents
immédiats et que la syphilis de celle-ci ne se révèle, le plus
souvent, que plus tard, par les fausses couches, par la nais-
sance d'enfants syphilitiques ou par des accidents syphili-
tiques personnels plus ou moins graves. »

Si, au cours de cette période de latence, la recherche des
signes minutieux de la syphilis — recherche sur laquelle
insiste Milian — constitue pour le spécialiste la base même
de son art et lui fournit l'occasion de prouver la haute qua-
lité de son sens clinique, il n'en demeure pas moins que le
diagnostic s'appuie fortement sur les réactions sérologiques.

La syphilis dûment reconnue, c'est encore la sérologie qui
exerce en grande partie le contrôle d'un traitement délicat,
et lorsque la négativation des réactions sérologiques paraît
acquise, c'est elle qui fournit, par ses explorations répétées,
un des meilleurs arguments — sinon le meilleur — en faveur
de la guérison stable de la maladie.

Est-ce à dire qu'en syphiligraphie tout se ramène à prati-
quer une réaction de Wassermann ? Certes non, et cette con-

ception simpliste est loin de notre pensée. Quelle que soit la valeur pratique de l'analyse sérologique, elle ne saurait représenter un procédé automatique de diagnostic. Mode particulier d'exploration intégré à la séméiologie générale, elle constitue simplement une des antennes de la Clinique. Là se borne son ambition.

« C'est au médecin qu'il appartient d'interpréter le symptôme sérologique, écrit Demanche, en le rapprochant des autres symptômes et de toutes les circonstances cliniques et étiologiques qu'il a pu relever. Le sérologiste ne doit pas se substituer au clinicien ; il n'a pas à poser un diagnostic ; il en fournit seulement un des éléments. Cet élément est si important que sa présence permet presque toujours d'affirmer la syphilis (1). »

On conviendra que le Laboratoire assume en cette matière une responsabilité particulièrement grave, car une erreur dans l'analyse sérologique, si elle peut être parfois redressée en temps utile, est malheureusement susceptible d'entraîner les plus redoutables conséquences individuelles et familiales.

Un rôle social d'une telle importance implique une organisation rationnelle de l'organisme, quel qu'il soit, qui en accepte la charge ; l'emploi obligatoire, bien que non exclusif, de procédés déterminés ; bref, une technique de travail soigneusement réglée — nous dirons même standardisée — dont la mise au point nous paraît constituer un problème particulièrement digne d'attention.

*
* *

L'idée d'une standardisation du séro-diagnostic de la syphilis (2) n'est pas nouvelle. Prônée par les uns, repoussée par les autres, elle est, en France tout au moins, fort discutée. Ceux qui la combattent sont, en général, de savants sérolo-

1. Demanche, in Jeanselme, *Traité de la syphilis*, t. II, Doin et Cie, Paris, 1931.

2. Nous n'avons en vue, ici, que les réactions d'hémolyse. La standardisation des procédés de floculation est pratiquement réalisée par le Kahn.

gistes qui placent au-dessus de toute autre préoccupation la liberté de recherche, et appliquent des procédés plus ou moins personnels auxquels ils demeurent attachés. Ceux qui la réclament sont des praticiens éloignés des grands centres, qui ont le plus grand besoin, quand ils s'adressent au Laboratoire, d'une réponse sûre. Saurait-on les en blâmer ?

Il ne faut pas confondre la recherche scientifique et les applications pratiques de la découverte. Si, dans le premier cas, l'indépendance la plus entière est la condition liminaire du progrès, dans le second, *l'assujettissement à des règles précises est la seule façon de conserver à la découverte sa valeur initiale.*

Loin de nous la pensée que l'on doive imposer une technique, à l'exclusion des autres. Il faudrait qu'elle fût parfaite. Mais il ne serait pas déraisonnable, semble-t-il, que l'on se mît d'accord sur les principes scientifiques qui doivent servir de base à une *réaction-type*, destinée à remplacer, pour l'usage courant, de trop nombreux procédés de valeur inégale.

Ces principes, nous avons cherché à les dégager de l'analyse minutieuse du mécanisme de la réaction. Bien qu'il ne s'agisse là que d'une première approximation, il nous paraît qu'il devient possible, dès maintenant, de mettre scientifiquement au point une réaction-standard.

Une telle réaction, au sérum chauffé, serait accompagnée, dans tous les cas, d'une réaction au sérum non chauffé, le Hecht avec détermination de l'index hémolytique (variante Mutermilch), et d'un procédé de floculation, le Kahn Standard. Correctement exécutées, ces trois réactions représentent, à notre avis, le *syndrome sérologique fondamental*.

Libre aux médecins, s'ils le désirent, de réclamer au Laboratoire telle technique supplémentaire de leur choix, et aux sérologistes de profession d'ajouter à la réaction-type d'autres procédés ayant leur préférence.

Il existe un contrôle officiel sur les médicaments, sur les sérums thérapeutiques. Toute expertise d'intérêt public comporte une méthode *officiellement recommandée*. Pourquoi n'en

serait-il pas de même en sérologie ? Le séro-diagnostic de la syphilis, maladie sociale, n'est-il pas une expertise d'intérêt public ?

Nous croyons qu'il y a là un double problème à examiner : problème technique, d'abord ; d'organisation sociale, ensuite.

Déjà, sous l'impulsion des Conférences internationales de Copenhague et de Montevideo, de fort utiles institutions comme l'Ecole de Sérologie (Institut Fournier), les laboratoires centraux de sérologie des Hôpitaux, quelques laboratoires inter-départementaux ont largement fait progresser le séro-diagnostic dans la voie de la normalisation.

Ne doutons pas que ces efforts conjugués ne parviennent, dans un avenir rapproché, à donner au diagnostic sérologique de la syphilis, partout où l'on y a recours, le haut degré de sécurité qu'il doit obligatoirement comporter.

PREMIÈRE PARTIE

La spécificité de la réaction de Bordet-Wassermann.

CHAPITRE PREMIER

L'immunité et le séro-diagnostic de la syphilis.

Le séro-diagnostic de la syphilis a suscité, en un quart de siècle, un nombre considérable de travaux de laboratoire, en liaison plus ou moins étroite avec l'observation clinique.

Malgré l'importance de ces recherches, poursuivies principalement en Allemagne et aux Etats-Unis, et si de sérieux progrès ont été réalisés dans le domaine des applications pratiques, on n'en doit pas moins convenir que la nature exacte des réactions sérologiques est loin d'avoir été complètement élucidée.

L'histoire de la réaction de Wassermann est curieuse. Dérivée directement de la méthode de Bordet et Gengou, elle ne tarda pas à être considérée par la plupart des sérologistes comme foncièrement différente de cette dernière. Et, lorsque la découverte des procédés de floculation eut mis en évidence les propriétés de surfloculance des sérums syphilitiques, on s'empressa de rattacher à ce phénomène, d'une séduisante simplicité, le mécanisme de la réaction d'hémolyse, d'autant plus volontiers que les autres applications de

la méthode de Bordet connaissaient des fortunes diverses et souvent peu encourageantes.

Depuis quelques années, cependant, l'attention est à nouveau attirée sur les propriétés réactionnelles des immun-sérums et l'on est parvenu à mettre en évidence la fonction antigène de certaines substances non protéidiques. Ces travaux récents autorisent à penser que la réaction de Wassermann pourrait à brève échéance reprendre sa place dans le cadre élargi des réactions antigéniques spécifiques.

Nous ne croyons pas inutile de retracer rapidement les principales étapes de cette évolution doctrinale avant d'exposer les raisons actuelles qui permettent de rattacher, à nouveau, la réaction de Wassermann au principe initial de Bordet.

LA DÉFENSE DES ORGANISMES VIVANTS ET L'ÉTAT DE MALADIE.

C'est une loi biologique fondamentale que tout organisme vivant réagit contre l'introduction d'une substance quelconque dans son milieu intérieur, c'est-à-dire contre toute perturbation de l'ordre structural et fonctionnel qui est le sien.

Cette réaction est très variable selon le degré de l'évolution de cet organisme, la nature et la quantité de la substance étrangère introduite, son agressivité, le mode d'introduction, la répétition du processus hostile, etc.

Parfois, la réaction est prompte et pleinement efficace : c'est dans ce cas que l'on constate l'excrétion pure et simple de substances instantanément maîtrisées, telles, par exemple, certaines matières colorantes.

Parfois encore, ces réactions sont nulles ou ont à peine le temps de s'ébaucher, la mort survenant rapidement : cette action d'inhibition brutale est caractéristique des substances qualifiées de poisons ou de venins.

Entre ces deux extrêmes, se place toute la série des réactions plus ou moins lentes et pénibles qui traduisent l'état

de lutte et réalisent le tableau d'une maladie toxique ou toxi-infectieuse.

L'organisme qui a triomphé d'une infection déterminée — c'est une notion bien connue — peut, dans certains cas et pour une durée variable, être immunisé contre toute atteinte ultérieure de la même maladie et, parfois, d'un certain groupe de maladies.

Il y a là, pourrait-on dire, en s'excusant d'employer une expression un peu hardie, une *connaissance acquise* en quelque sorte végétative de l'agresseur et des moyens propres à parer à l'agression. Le rôle du système nerveux dans l'Immunité a été mis en évidence par tout un ensemble de travaux modernes (Metelnikoff, Chorine, Mlle Ermolaëff, etc.) et l'on peut se demander si l'on n'a pas confondu, trop souvent à tort, les réactions de défense de l'être vivant avec quelques propriétés physico-chimiques des humeurs (1).

Il est incontestable que ces propriétés, liées probablement à la présence de substances parfaitement définies, existent dans le sérum de nombre d'individus infectés ou ayant triomphé d'une infection. Mais quel rôle jouent-elles dans l'état de prémunition ?

En s'en tenant strictement aux faits expérimentaux, on peut énoncer le principe suivant : toute substance possédant une spécificité biochimique et constituant un danger pour l'organisme peut être neutralisée par une *substance anticorps* qui lui est exactement adaptée.

La *substance antigène* peut être d'origine microbienne mais elle peut également provenir de l'organisme lui-même, et c'est là un autre aspect de l'état de maladie au cours des infections.

1. Certains phénomènes, dits immunitaires, tels que l'agglutination, la précipitation, etc., sont sous la dépendance de propriétés physiques nouvelles du sérum sanguin, mais sont loin de représenter la défense complète de l'organisme contre tel microbe déterminé. C'est ainsi que l'agglutination, qui ne se manifeste jamais *in vivo*, n'entrave en rien, *in vitro* le développement des microbes et leurs propriétés virulentes. L'antisérum le plus actif laisse toute leur vitalité, même en présence d'alexine, aux micro-organismes correspondants. Il en est de même des vibriens cholériques au cours du phénomène de Pfeiffer.

Celui-ci ne représente pas seulement, en effet, la lutte contre le germe infectieux et les produits qu'il sécrète, mais aussi une réaction contre la déficience physiologique des organes et la *dégradation des tissus de l'être malade*. Ce dernier point est ici d'une particulière importance.

Certains agents pathogènes — et le Spirochète de Schaudinn paraît bien appartenir à ce groupe — sont moins dangereux par les toxines qu'ils sécrètent que par l'action qu'ils mènent dans l'intimité des tissus. En plus des désordres, d'ordre physiologique, la désintégration chimique qui en résulte libère des substances qui, pour provenir de l'organisme lui-même, n'en sont pas moins devenues, à cause de la transformation qu'elles ont subie, complètement étrangères et pourvues d'une agressivité biologique non douteuse.

Il ne faut donc pas s'étonner de constater parfois, dans les humeurs d'un individu malade, l'absence d'anticorps dirigés contre l'agent causal, et de pouvoir y mettre en évidence des anticorps flocculant avec des substances dont l'origine doit être recherchée dans les tissus eux-mêmes.

Telle infection peut avoir ainsi une *caractéristique biochimique indirecte* parfaitement déterminée. Il semble bien que ce soit le cas de l'infection syphilitique.

LE PRINCIPE DE BORDET ET GENGOU.

Certaines substances biologiques, injectées à l'animal, semblent provoquer plus aisément que d'autres l'apparition de propriétés physico-chimiques nouvelles dans le sérum sanguin.

Ainsi, de nombreuses recherches sur les réactions anticorps ont été effectuées en employant des globules rouges, à cause de la netteté avec laquelle se manifeste, par l'hémolyse, la moindre altération du stroma globulaire.

Dès 1875, Crette et Langlois constatèrent l'action « globulicide » du sérum d'un animal pour les hématies d'un autre animal.

Büchner (1898) étudia systématiquement cette propriété nouvelle. Il constata qu'elle était supprimée par le chauffage à 56° et la rattacha à un principe nouveau qu'il nomma *alexine*. En injectant à des cobayes du sang défibriné de Lapin, il parvint à exalter le pouvoir lytique du sérum de Cobaye.

Mais c'est Bordet qui, dans une série de travaux remarquables (1896-1900), analysa avec une rare pénétration le mécanisme de l'hémolyse biologique et sut mettre en évidence dans les sérums hémolytiques, en plus de l'alexine de Büchner, principe thermolabile, une sensibilisatrice spécifique thermostable.

« Confinée jusqu'alors (1897), écrit Bordet dans son *Traité de l'Immunité dans les maladies infectieuses*, à l'étude des réactions provoquées par les microbes, toxines ou venins, l'immunité vit son horizon s'élargir considérablement lors de la découverte des sérums hémolytiques et, en général, des sérums actifs sur les albuminoïdes de provenance animale, qui, tout en lui fournissant des techniques applicables aussi à la pathologie la fit pénétrer plus profondément dans le domaine de la chimie physiologique et contribuer, grâce notamment au fait si remarquable de la spécificité des anticorps, à l'étude des rapports entre les espèces. »

De ces belles recherches, Bordet et Gengou devaient tirer, en 1901, la *réaction de déviation du complément*. Grâce à l'ingénieux emploi d'un mélange de globules et de sensibilisatrice anti-globules — ensemble fonctionnant comme un test particulièrement sûr de liberté ou de blocage de l'alexine — ces auteurs parvinrent à mettre en évidence la fixation spécifique de cette dernière et, par conséquent, à déceler une sensibilisatrice à l'aide d'un antigène ou un antigène à l'aide de sensibilisatrice correspondante.

La portée de cette découverte apparut d'emblée considérable pour le diagnostic des affections microbiennes. Le sérum d'un individu infecté, renfermant, par hypothèse, une sensibilisatrice spécifique, il semblait qu'on dût nécessaire-

ment, à l'aide de la réaction de Bordet et Gengou, soit identifier par tâtonnements l'agent causal, soit vérifier une hypothèse étiologique microbienne.

Malheureusement, ce procédé appliqué au diagnostic de la tuberculose, du charbon, de la scarlatine, de la coqueluche, de la sporotrichose, etc., devait réserver à ses promoteurs les plus amères désillusions.

C'est que l'immunité réelle — nous l'avons exposé plus haut — est peut-être moins liée, dans certains cas, à la présence d'anticorps dans les humeurs qu'au comportement particulier de l'organisme vivant. En outre, à supposer que l'on connaisse le véritable antigène et qu'il existe réellement des modifications spécifiques dans le sérum examiné, il y a, entre le principe et sa réalisation pratique, un ensemble de conditions physico-chimiques que nous commençons à peine à entrevoir aujourd'hui et auxquelles est très étroitement subordonnée la bonne marche de la réaction.

LA RÉACTION DE WASSERMANN.

Au milieu des vicissitudes d'une pratique aussi souvent décevante de la réaction-type, l'application de cette dernière au diagnostic de la syphilis devait, tout au contraire, connaître un succès sans cesse croissant.

En mars 1905, Schaudinn et Hoffmann découvraient l'agent pathogène de la syphilis, *Spirochaete pallida* (devenu *Treponema pallidum*), deux ans après les travaux de Metchnikoff et de Roux, par lesquels ces savants avaient démontré l'inoculabilité du virus syphilitique aux singes anthropoïdes.

Aussitôt, Wassermann, Neisser et Brück imaginèrent de se servir de l'extrait aqueux d'un organe riche en Tréponèmes, le foie hérédo-syphilitique, comme antigène susceptible d'entrer en réaction avec la sensibilisatrice spécifique du sérum des syphilitiques, dans le dispositif de Bordet et Gengou.

Le 10 mai 1906, ces auteurs pouvaient annoncer la découverte du séro-diagnostic de la syphilis. Quelques jours plus

tard, Detré, à Vienne, parvenait au même but en se servant également d'extraits aqueux de foie ou de pancréas infestés de Tréponèmes.

La nouvelle réaction connut, sous sa forme primitive, de graves défaillances : au début, sur 257 cas de syphilis, Wassermann n'obtint que 49 réactions positives.

Cependant, la méthode, bien qu'imparfaite, se montrait intéressante. Citron, à la clinique de Kraus, en poursuivait l'étude pratique, et il était en mesure de présenter en 1907, au Congrès de Berlin, une statistique de 94 cas avec 88 % de résultats positifs.

Dès lors, la réaction de Wassermann était lancée et devait rendre célèbre dans le monde entier le nom d'un de ses auteurs. Très rapidement, elle fut l'objet d'un nombre considérable de recherches.

En 1907, Levaditi et Marie montrèrent que cette réaction ne paraissait pas être une réaction antigène-anticorps : 1^o parce qu'on pouvait, dans la préparation de l'antigène, remplacer le foie hérédito-syphilitique par un foie normal, ou tout simplement par des sels biliaires ; 2^o parce que le liquide céphalo-rachidien des paralytiques généraux donnant une réaction très positive et supposé, par conséquent, être riche en anticorps, est incapable de détruire *in vitro* le tréponème ou d'atténuer sa virulence pour le Singe supérieur.

Landsteiner, Muller et Pöetzl, Porges et Meier, Levaditi et Yamanouchi reconnurent que les substances actives de l'extrait de foie sont solubles dans l'alcool. De nombreux auteurs parvinrent à obtenir une réaction positive avec les extraits les plus variés, animaux ou végétaux, et avec des substances chimiquement définies.

La réaction de Wassermann fut alors considérée, presque unanimement, comme un simple phénomène physico-chimique sans aucun rapport avec l'Immunité et le principe de Bordet-Gengou.

LA FONCTION HAPTÈNE.

L'apparition dans le sérum de propriétés *anticorps* est liée à l'intrusion dans l'organisme, ou à une tentative d'intrusion, d'une substance *antigène*.

La fonction antigène est soumise, selon Ehrlich, à deux conditions : 1^o provoquer *in vivo* la formation d'anticorps ; 2^o réagir *in vitro* avec ces anticorps, soit pour fixer le complément, soit pour flocculer.

On pensait jusqu'à ces dernières années que, pour constituer un antigène, une substance devait : 1^o être de nature albuminoïde ; 2^o être hétérogène, c'est-à-dire ne pas appartenir à l'animal en expérience.

Or, il est, à présent, prouvé que des substances non protéidiques peuvent fort bien être d'authentiques antigènes. Sachs, qui les a particulièrement étudiées, en collaboration avec ses élèves Klopstock, Weil, Selter, Witebsky, leur a donné le nom d'*haptènes*.

Les haptènes ne possèdent, à l'état isolé, que la seconde propriété antigénique ; ils n'acquièrent la première qu'à la condition d'être greffés sur un noyau albuminoïde qui leur sert de vecteur.

Ces substances hapténiques appartiennent, pour certains auteurs, soit au groupe des glucides, soit à celui des lipides. Pour d'autres [Anderson et Roberts (1930), Chargaff et Anderson (1933)], ce sont des complexes lipo-glucidiques].

Les recherches poursuivies à l'Institut Rockefeller par Heidelberger, Avery, Dubos, Goebel, Morgan (1925-1927) ont bien mis en évidence cette propriété antigénique de certains hydrates de carbone d'origine microbienne déterminée.

Ces auteurs sont parvenus à isoler de 300 litres de culture de pneumocoques du type II, par précipitation spécifique, 2 à 3 grammes d'une substance qui est un polysaccharide. Chaque type de pneumocoque a donné ainsi un polysaccharide rigoureusement spécifique de la race microbienne dont il était issu et réagissant, en présence de l'antisérum corres-

pendant, à la concentration extraordinairement faible de 1 : 5.000.000.

Afin d'en faire des antigènes complets, Avery et Goebel parvinrent à fixer ces polysaccharides sur un support protéidique (1).

Ils réalisèrent, d'abord, la synthèse de deux monosaccharides, le *p. aminophénol* — β — *glucoside* et le *p. aminophénol* — β — *galactoside*. Ces corps furent diazotés suivant la méthode de Pauly et combinés à la sérum globuline du Cheval.

On obtint ainsi un antigène qui immunisa parfaitement le Lapin, et dont la spécificité était liée au radical sucre.

Par le même procédé, Goebel et Avery préparèrent l'ester paraminobenzylique du glucide III, qu'ils accolèrent ensuite à un protéide. Le complexe ainsi obtenu se révéla être un antigène complet. En effet, le sérum de Lapin préparé à l'aide de cet antigène : 1^o agglutine le pneumocoque III ; 2^o précipite le polysaccharide III ; 3^o protège la Souris contre l'infection par les microbes de ce type.

Les *lipoides*, de leur côté, se sont montrés d'aussi bons antigènes hapténiques que les polysaccharides précédents. Landsteiner (1919) en a apporté la preuve par ses études sur l'*antigène hétérogène de Forssmann*.

En 1911, Forssmann découvrit que des émulsions d'organes de Cobaye, injectées au Lapin, provoquent chez celui-ci l'apparition d'anticorps hémolytiques vis-à-vis des globules de Mouton.

Il fallait en conclure qu'il existait une substance antigénique commune dans les organes du Cobaye et dans les hématies du Mouton. Les expériences entreprises montrèrent qu'il en est bien ainsi, et que, de plus, cette substance se rencontre également chez certains animaux et manque totalement chez les autres. D'où, deux groupes zoologiques, suivant qu'existe

1. La spécificité acquise par la gluco-protéide est déterminée par la constitution chimique du glucoside. C'est ainsi que pour les osides α ou β du glucose ou du galactose, le type de la liaison osidique (α ou β) ou la structure stéréochimique du sucre, suffisent à déterminer la spécificité immunologique.

ou non l'antigène de Forssmann : le groupe du Cobaye et celui du Lapin.

Les individus de l'espèce humaine se répartissent, à cet égard, en deux catégories : l'une fait partie du groupe du Cobaye, et comprend les hommes qui appartiennent aux types séro-anthropologiques I et II, l'autre fait partie du groupe du Lapin, et comprend les individus des groupes III et IV de la classification de Moss.

Or, l'antigène de Forssmann est de nature lipoïdique. Comme l'ont montré Doerr et Pick, Sachs et Georgi, il est soluble dans l'alcool, insoluble dans l'eau et l'acétone et appartient probablement au groupe des phosphatides. Landsteiner a montré que ses extraits alcooliques réagissent *in vitro* en présence des anticorps correspondants.

D'autres antigènes lipoïdiques ont été étudiés avec précision. Bordet et Renaux ont fait flocculer des anticorps hémolytiques par l'*extrait alcoolique* des globules rouges contre lesquels ces anticorps étaient dirigés.

Bocquet et Nègre (1920) ont extrait des cultures de bacilles de Koch des lipoïdes capables de fixer les anticorps du sérum des tuberculeux (*antigène méthylique*).

Ces expériences établissaient déjà avec vraisemblance, la propriété hapténique des lipoïdes.

Mais en outre, Landsteiner est parvenu, en 1923, en les copulant avec un noyau albuminoïde quelconque, à leur conférer la propriété antigénique complète. C'est la méthode dite de l'*immunisation combinée*, expression, par ailleurs, peu heureuse.

En injectant un complexe lipo-protéidique de Cobaye dans les veines du Lapin, on obtient un sérum possédant des propriétés hémolytiques caractéristiques et réagissant *in vitro* avec l'antigène de Forssmann.

Les lipoïdes sont par conséquent — la preuve en est faite — susceptibles de constituer de véritables antigènes. L'hétérogénéité n'est même pas une condition nécessaire à leur efficacité. Ils peuvent provenir de l'animal même auquel on les injecte : *il est possible d'immuniser un animal contre les lipoïdes*

de ses propres organes. Nous verrons plus loin que cette notion paraît être à la base même de la réaction de Bordet-Wassermann.

Quelle est la *spécificité* de ces antigènes lipoïdiques ?

Pratiquement, ils peuvent présenter une des quatre sortes de spécificités suivantes :

- 1^o une *spécificité zoologique*, en rapport avec l'espèce. C'est le cas des hématies ; les anticorps correspondants sont dirigés contre un animal déterminé ;
- 2^o une *spécificité histologique*, non en rapport avec l'espèce animale, mais avec un organe ou un tissu déterminé. C'est ainsi qu'Uhlenhuth pour le cristallin, Sachs et Witebsky pour le cerveau, ont préparé des sérums anticristallin et anticerveau rigoureusement spécifiques de l'un et l'autre organes, quelle que soit leur provenance zoologique ;
- 3^o une *spécificité de groupe*, caractéristique, par exemple, des groupes sanguins ; ou encore, du groupe Cobaye, du groupe Lapin (antigène de Forssmann) ;
- 4^o une *spécificité polyvalente*, correspondant probablement à la réunion de plusieurs antigènes simples dans le même extrait, la spécificité de chacun se trouvant confondue dans la complexité de l'ensemble.

Les antigènes de la réaction de Wassermann appartiennent probablement à cette dernière catégorie.

NATURE DU SÉRO-DIAGNOSTIC DE LA SYPHILIS.

Sachs, Klopstock et Weil, en 1925, en appliquant la méthode générale de Landsteiner aux extraits lipoïdiques utilisés dans le séro-diagnostic de la syphilis, sont parvenus

à rendre des Lapins *artificiellement positifs* à la réaction de Wassermann, en dehors de toute infection tréponémique.

Césari, en 1930, et, après lui, Demanche, ont, par le même procédé, préparé des Lapins dont le sérum fournissait des réactions positives, aussi bien par les méthodes de floculation que par celles de déviation du complément.

On peut tirer de ces expériences les deux conclusions suivantes :

1° *Le sérum des sujets atteints de syphilis présente des propriétés anticorps qui correspondent spécifiquement aux extraits lipoïdiques — ou à une partie seulement de ces extraits — employés dans la réaction de Wassermann.*

2° *Les réactions sérologiques de la syphilis sont de véritables réactions anticorps-antigène.*

Il est à noter que l'injection de ces antigènes lipoïdiques ne confère à l'animal aucune immunité antitréponémique, pas plus d'ailleurs que l'injection de tréponèmes tués, ainsi que l'ont vu Levaditi et Lépine.

Quelle est l'origine des lipoides-antigènes qui provoquent dans l'organisme humain, au cours de l'infection syphilitique, l'apparition d'anticorps et la positivité des réactions sérologiques ?

L'origine tréponémique a été soutenue par Bergel (1922). On sait que, d'après Pappenheim, il ne se formerait de lymphocytomes locaux qu'autour des agents de granulomatose chronique (syphilis, tuberculose, lèpre, actinomycose). Or, ces agents présenteraient tous une game lipoïdique, contre laquelle serait dirigée l'action diastasique des amas de mononucléaires caractéristiques de ce genre d'inflammation. Il y aurait même, pour Bergel, parallélisme entre cet aspect anatomo-pathologique et le sens des séro-réactions.

Mais l'origine tissulaire paraît actuellement plus défendable que la précédente.

La maladie syphilitique semble s'accompagner d'une lente désintégration cellulaire qui aboutit, entre autres, à la mise en liberté de lipoides protoplasmiques.

Sachs et l'école d'Heidelberg ont caractérisé, dans le liquide céphalo-rachidien des paralytiques généraux, des anticorps anticerveau dirigés contre des lipoides cérébraux formés sur place.

Demanche (1934) a préparé des extraits cérébraux qu'il a utilisés, comparativement avec des extraits myocardiques, comme antigènes sérologiques, au cours des manifestations métasyphilitiques.

Lorsque la syphilis intéresse le névraxe, il semble que ces extraits se montrent plus sensibles que l'antigène habituel pour déceler des anticorps dans le liquide céphalo-rachidien, mais considérablement moins sensibles pour les déceler dans le sérum sanguin.

Cet auteur a pratiqué, à l'aide de ces extraits cérébraux, l'examen sérologique de 235 paralytiques généraux et de 36 tabétiques.

Dans le sérum sanguin, 5 % seulement des réactions furent positives au cours de la paralysie générale. Aucune ne fut positive chez les tabétiques. Par contre, il y eut 61 % de résultats positifs dans le liquide céphalo-rachidien des tabétiques ; 92 % dans le liquide céphalo-rachidien des paralytiques généraux pris en dehors des rémissions.

Ces résultats, qui confirment les conceptions de Sachs et de ses élèves, ainsi que celles de Ravaut et de Bocage (1924) sur la formation *in situ* des constituants du liquide céphalo-rachidien, montrent que :

- 1^o il y a, au cours de la paralysie générale et du tabes, *disponibilité* de lipoides caractéristiques, par désintégration de complexes tissulaires au niveau du tractus encéphalo-médullaire ;
- 2^o ces lipoides entraînent l'apparition de propriétés anticorps spécifiques dans le liquide céphalo-rachidien ;
- 3^o les réagines correspondantes peuvent être décelées en employant, comme antigène, des lipoides provenant des tissus lésés.

En conformité avec les vues précédentes, on peut se demander si les réagines du sérum sanguin ne sont pas dirigées contre des lipoides provenant de la paroi des vaisseaux.

On sait la prédilection que manifeste le tréponème pour les parois vasculaires. Voici ce qu'écrivait à ce sujet I. de Jong, qui a consacré à l'anatomie-pathologique de la syphilis un article dans le *Traité de la Syphilis* de Jeanselme.

« On est frappé de constater que les lésions les plus récentes que l'on examine présentent toujours un maximum autour des vaisseaux, artères et veines, et dans les parois des vaisseaux...

« Ces deux éléments fondamentaux, vascularite et réaction conjonctive, nous les retrouverons prédominant dans toute l'histoire anatomo-pathologique de la syphilis.

« Tout le monde connaît le rôle fondamental de l'artérite syphilitique en pathologie. Dans toutes les manifestations syphilitiques tertiaires, quels que soient leur nature et leur siège, l'endopériartérite de Darier est l'élément le plus constant et le plus caractéristique, rôle qui ne diminue pas l'importance, qu'il ne faut pas oublier, des lésions veineuses.

« Nous ne pouvons rappeler ici le détail des lésions de ces artérites syphilitiques qui peuvent frapper soit l'endartère, soit la périartère, soit toutes les parois de l'artère (panartérite de Darier). Cet auteur a donné un résumé saisissant des conséquences de ces différentes lésions : l'épaississement de l'endartère rétrécit le calibre du vaisseau, d'où anémie du territoire irrigué et même oblitération lorsqu'il y a thrombus. Les altérations anatomiques de la tunique moyenne en diminuant la résistance de l'artère amènent son ectasie et même sa rupture ; la périartérite favorise l'extension et la diffusion du processus inflammatoire aux organes et aux tissus voisins. Ce que M. Darier a bien montré pour les artères cérébrales, M. Letulle l'a montré pour l'aorte au niveau de laquelle les lésions syphilitiques atteignent toutes les couches du vaisseau.

Plus ou moins associé aux lésions artérielles, mais aux lésions artérielles des tout petits vaisseaux, un autre processus d'activité de la syphilis à une période plus avancée de la maladie se caractérise par les nodules inflammatoires auxquels on a donné le nom de gommès. »

L'étude de la syphilis expérimentale chez le Singe et le Lapin a mis en évidence la précocité de la phase septicémique au cours de cette infection. Pearce et Brown ont montré que, chez le Lapin, deux jours après la contamination, les ganglions tributaires sont déjà inoculables, et cinq jours après la contamination, le sang du Lapin inoculé est devenu virulent. C'est là un phénomène général. Il est suivi de près par l'altération histo-chimique des vaisseaux, laquelle pourrait être considérée comme une caractéristique de la syphilis. Cette altération aurait pour effet de mettre « en liberté » des lipoprotéïdes hapténiques.

Or, les lipoprotéïdes de constitution sont spécifiques des organes dont ils émanent, ainsi que l'ont montré E.-J. Terroine et ses collaborateurs à la suite de Mayer et Schaeffer (1). Ils provoqueront donc l'apparition dans le sang d'anticorps spécifiques.

Septicémie précoce, vascularite intense en certains points, moins apparente en des endroits où elle ne se manifesterait que tardivement, mise en liberté de lipoprotéïdes hapténiques spécifiques du tissu vasculaire, tels sont les termes d'une hypothèse vraisemblable sur la nature et l'origine des anticorps sériques caractéristiques, au point de vue sérologique, de la maladie syphilitique.

L'emploi actuellement généralisé d'extraits myocardiques, donc de lipoprotéïdes vasculaires, comme antigène dans les séro-réactions, renforce l'argumentation précédente.

Le fondement biologique de la réaction de Wassermann pourrait donc être représenté par le schéma suivant :

1. Se reporter au chapitre suivant.

Manifestations physiopathologiques de la maladie syphilitique.

Désintégrations protoplasmiques au niveau du système vasculaire et mise en liberté de lipoides caractéristiques du système endothélio-vasculaire.

Présence dans le sérum sanguin de réagines spécifiques de ces lipoides.

Désintégrations protoplasmiques au niveau du système nerveux et mise en liberté de lipoides caractéristiques du tissu nerveux.

Présence dans le liquide céphalo-rachidien de réagines spécifiques de ces lipoides.

Réactions sérologiques.

SÉRUM.

Emploi d'un antigène constitué par des extraits de tissu vasculaire (myocarde).

LIQUIDE CÉPHALO-RACHIDIEN.

Emploi d'un antigène constitué par des extraits de tissu nerveux (cerveau).

Il ne s'agit, dans cette hypothèse, que d'une prédominance, dans le sérum ou dans le liquide céphalo-rachidien, de l'une de ces réagines par rapport à l'autre.

CHAPITRE II

L'antigène spécifique.

L'antigène est le plus important des réactifs qui interviennent dans la réaction de Wassermann.

S'il est vrai que de fortes positivités syphilitiques peuvent être mises en évidence à l'aide d'extraits lipoidiques variés, d'origine animale ou végétale, il y a loin d'une telle réaction antilipoïdique de groupe à la détection sûre des réactivités souvent faibles des syphilis latentes ou en traitement et de certaines formes d'hérédosyphilis.

Toutefois, il n'est pas, pour apprécier la qualité d'un antigène, que son comportement en présence d'un sérum à faible potentiel syphilitique : pour qu'une telle positivité, plus ou moins atténuée, ait quelque valeur diagnostique, il est nécessaire que la réaction puisse être considérée comme *rigoureusement spécifique*, c'est-à-dire qu'elle soit constamment négative en dehors de la syphilis (tuberculose cutanée, lèpre, affections hépatiques, gravidité, etc.).

C'est dans ces cas-limites que s'affirme — au sein d'un dispositif correct — la spécificité d'un antigène à valence nettement prédominante, à défaut d'un antigène monovalent, non encore obtenu.

I. — Polyvalence et spécificité hapténique d'un antigène.

Nous avons vu, dans la première partie de cet exposé, que les recherches de Sachs, Klopstock et Weil, celles de Césari et de Demanche, sur la réactivité syphilitique artifi-

cielle des Lapins, en dehors de toute infection par le tréponème, ont apporté la preuve de la qualité hapténique des extraits utilisés dans les séro-réactions.

Ces lipoïdes ubiquitaires de l'antigène de Wassermann sont polyvalents et peuvent être considérés, avec quelque vraisemblance, comme des complexes d'haptènes oligovalents ou même monovalents.

Or, les extraits lipoïdiques polyvalents renferment souvent un haptène prédominant. Ce fait a été mis en évidence par Sachs qui a montré qu'une véritable *concurrence antigénique* peut supprimer, plus ou moins complètement, l'action biologique des antigènes partiels avoisinant l'antigène principal.

« Chaque cellule, chaque humeur, écrit à ce propos Charles Nicolle, sont spécifiques par coexistence constante de certains antigènes et dominance habituelle de l'un d'entre eux. »

Ce caractère de *prédominance* d'un haptène déterminé est vrai, surtout, pour les lipoïdes doués d'une spécificité de groupe ou d'organe.

Il joue un rôle fort important dans le procès d'immunisation. C'est ainsi que Césari (1930) est parvenu à caractériser, dans un antiserum polyvalent, une réactivité spécifique de l'haptène prédominant dans l'antigène complexe correspondant à cet antiserum.

On sait, d'autre part, que des arguments de valeur peuvent être invoqués en faveur de la théorie de la *disponibilité* de certains lipoïdes tissulaires chez les syphilitiques.

Demanche (1934) a montré, à la suite de l'Ecole d'Heidelberg, que les réagines du liquide céphalo-rachidien sont dirigées contre des lipoïdes encéphalo-médullaires, et l'on peut émettre l'hypothèse parallèle que celles du sérum sanguin sont dirigées contre des lipoïdes vasculo-tissulaires.

Les résultats expérimentaux auxquels nous faisons allusion ont le grand mérite de faire entrevoir la nature de l'antigène syphilitique réel, vraisemblablement formé d'un ou de plusieurs haptènes déterminés. Il est possible que,

dans ce dernier cas, ceux-ci correspondent à des phases successives de la maladie.

La préparation de l'antigène sérologique doit tendre, par conséquent, à obtenir cette fraction hapténique spécifique à l'état aussi pur que possible, ou, tout au moins, à lui assurer une prédominance suffisante sur le reste de la mosaïque antigénique.

C'est, bien entendu, d'une façon tout empirique, et par des extractions successives à l'aide de solvants divers, que l'on cherche — en attendant une méthode plus rigoureuse — à séparer les lipoides spécifiques des lipoides indifférents ou nuisibles.

II. — Principaux types d'extraits antigéniques.

Les extraits aqueux de foie de fœtus hérédosyphilitique, employés au début par Wassermann, n'ont plus qu'un intérêt historique.

On se sert actuellement d'extraits de composition complexe, obtenus par épuisement de certains organes d'Homme ou d'animaux, à l'aide de solvants neutres. Le foie, la rate, le poumon, le pancréas, la surrénale, les hématies, le sérum, les leucocytes ont été employés, tour à tour, sans fournir de résultats particulièrement satisfaisants.

C'est le cœur qui semble avoir donné, entre les mains de nombreux expérimentateurs, les meilleurs extraits, et si quelques sérologistes sont demeurés fidèles au fœtus hérédosyphilitique, la plupart emploient, à présent, des extraits de myocarde d'Homme, de Veau ou de Bœuf.

Il y a là, notons-le en passant, une coïncidence frappante entre ce choix, dicté par l'expérience entièrement dégagée de toute idée préconçue, et l'hypothèse de l'origine vasculaire de l'haptène ou de l'un des haptènes en cause dans la syphilis. Nous avons déjà attiré l'attention sur ce fait important.

C'est Levaditi et Marie qui, en 1907, ont montré que les substances actives de l'antigène de Wassermann sont solubles

dans l'alcool éthylique. Mais ces extraits alcooliques renfermaient également des substances qui gênaient la bonne marche de la réaction, notamment des substances anticomplémentaires.

A Noguchi (1909) revient le mérite d'avoir montré que les produits nuisibles sont solubles dans l'acétone, tandis que la fraction utile est insoluble dans ce dernier. Cette découverte a fait faire un progrès considérable à la préparation des antigènes.

Il n'est pas dans notre intention de procéder ici à l'inventaire complet des divers antigènes qui ont pu être préconisés en sérologie. Nous ne parlerons que de ceux qui sont caractéristiques d'une méthode générale de préparation, en ayant en vue, surtout, les extraits de myocarde.

Épuisement alcoolique simple. — Ce genre de préparation, qui remonte aux premiers essais de Levaditi et Marie, a été supplanté par l'extraction acétono-alcoolique. Cependant, appliqué au foie de fœtus hérédo-syphilitique, il donnait, encore que de façon inconstante, des extraits spécifiques et sensibles.

Latapie (1917) broie un fragment de foie hérédo-syphilitique et le dessèche dans le vide, en présence d'acide sulfurique. Après dessiccation et nouveau broyage, la poudre est mise à macérer dans l'alcool absolu, pendant 15 à 20 jours, dans la proportion de 20 gr. de poudre pour 100 cmc. d'alcool. On ajoute, à nouveau, 25 cmc. d'alcool au bout de ce délai.

Wyler a recours à la simple extraction alcoolique, sur pulpe fraîche, de myocarde humain, sans aucun épuisement préalable, ni par l'acétone ni par l'éther ; mais il se débarrasse, à la glacière, des substances insolubles dans l'alcool refroidi, si bien que son extrait ne représente pas la fraction alcoolique totale. D'ailleurs, cet alcool n'a qu'un pouvoir extractif relativement faible, étant donné son titre résultant.

L'antigène ainsi préparé a généralement une certaine acti-

tivité anticomplémentaire, d'autant plus qu'il est cholestérolé à 0,4 % au moment de l'emploi. Mais cela n'est pas gênant dans les procédés au sérum chauffé, car on dose habituellement le complément en présence de l'antigène ; et, d'autre part, certains auteurs préfèrent un léger degré d'anticomplémentarité, avec conservation de toute la fraction spécifique, à la perte supposée d'une partie de cette fraction au cours du traitement par l'acétone ou par l'éther.

L'extrait préparé par Sachs, à l'Institut pour l'étude expérimentale du cancer d'Heidelberg, sous le nom de *citochol extrakte* est également un extrait alcoolique, sans aucun épuisement préalable. La pulpe fraîche est traitée directement par l'alcool à 95°, dans la proportion de 5 cmc. de ce dernier pour 1 gr. de pulpe. La solution ainsi obtenue est évaporée à siccité, puis le résidu est repris par un volume d'alcool trois fois plus faible que le volume primitif, et cholestérolé de 0, 3 à 0, 6 %.

Pour une même quantité de pulpe humide, Sachs emploie environ six fois moins d'alcool que Wyler. Les substances peu solubles, dont Wyler se débarrasse à la glacière, sont dissoutes en moindre quantité dans le procédé de Sachs, étant donné le volume moindre du solvant.

Cet extrait primaire est ensuite étendu de sept fois son volume d'alcool à 95°.

Épuisement par l'éther. — Lesser a proposé, en 1909, le simple épuisement à l'éther du myocarde humain, pendant 24 h. On évapore ensuite l'éther et l'on reprend l'extrait sec par le sérum physiologique phénolé à 0, 5 %. C'est sous cette forme que l'on conserve l'extrait à la température du laboratoire. D'après Lesser et Klager, cet antigène serait plus sensible, en particulier dans les réactions avec le sérum des nourrissons, que l'extrait alcoolique habituel. Nous reviendrons, plus loin, sur cette question importante de la fraction étherique.

Épuisement acéto-alcoolique. — A la suite de Noguchi et

de Tribondeau, Bordet et Ruelens (1919) ont fixé un mode de préparation actuellement classique.

On laisse en contact 100 gr. de pulpe de cœur de Veau et 125 cmc. d'alcool à 95°, pendant quatre jours, à la température du laboratoire. Puis on filtre, et l'on dessèche la pulpe à l'étuve à 37°. On épuise ensuite, à deux reprises, à l'aide de 200 cmc. d'acétone qu'on laisse en contact, chaque fois, pendant une dizaine de jours. Le résidu, rapidement desséché, est traité par 200 cmc. d'alcool à 95° pendant douze jours, à 20°. On obtient ainsi un liquide jaune d'or, parfaitement limpide, en général dénué de propriétés hémolytiques ou anti-complémentaires.

Ce procédé, employé dans la plupart des laboratoires, a subi des modifications portant sur les proportions, les durées de contact, etc., mais le principe est toujours le même : fixation par l'alcool, dessiccation, épuisements successifs par l'acétone et l'alcool.

Epuisement éthéro-alcoolique. — L'extraction éthérique peut être poussée très loin ou, au contraire, être incomplète.

Le premier mode se trouve réalisé dans la préparation de l'antigène de Desmoulière.

On dessèche, dans le vide sulfurique, la pulpe d'un fragment de foie humain normal ou hérédosyphilitique, puis on la place à l'étuve à 37° pendant 48 heures. On l'épuise alors, par l'éther anhydre, jusqu'à ce que la poudre d'organe ne cède plus rien au solvant ; puis, on met macérer 1 gr. avec 10 cmc. d'alcool absolu, à la température de 37° pendant 3 jours. Après filtration, on ajoute 0 gr. 10 de cholestérol pour 10 cmc. du filtrat, et l'on conserve la solution à l'abri de la lumière et à la température du laboratoire.

L'extraction ménagée, à l'éther, est employée actuellement par de nombreux auteurs. Le nombre de lixiviations et la durée du contact sont très variables. En général, il s'agit plutôt d'une action courte et peu répétée.

Demanche, à la suite de Kahn, traite à quatre reprises différentes, et chaque fois pendant dix minutes, une poudre myo-

cardique par l'éther anhydre. Après cet épuisement, l'extrait alcoolique au 1/10 constitue l'antigène.

Hinton épuise 100 gr. de poudre de viande de bœuf par 400 cmc. d'éther pendant dix minutes et renouvelle trois fois de suite cette opération. La poudre est ensuite traitée par l'alcool dans la proportion de 1 gr. de cette dernière pour 5 cmc. de solvant. L'antigène ainsi obtenu est employé indifféremment dans les réactions de fixation ou de floculation.

Une telle extraction éthérique, après simple dessiccation, se trouve en concurrence avec l'extraction acétonique après fixation par l'alcool et dessiccation. Nous reviendrons sur cette importante question.

III. — Les lipoïdes.

Avant de poursuivre plus avant l'étude de l'antigène de Wassermann, il n'est pas inutile de préciser ce que l'on entend actuellement sous la dénomination de substances lipoïdiques, expression qui revient sans cesse sous la plume quand on traite de la chimie-physique de l'Immunité.

Les lipoïdes, dont l'importance biologique est considérable, ont fait l'objet de nombreux travaux, au cours de ces dernières années. On est parvenu à mettre un peu d'ordre dans un groupe extrêmement confus de corps dont la seule attache était un caractère commun de solubilité dans certains solvants neutres.

En réalité, ce mot de *lipoïdes*, créé par Overton (1901) à propos d'une théorie sur la perméabilité des membranes cellulaires, n'avait, à l'origine, aucune prétention à la classification chimique : il désignait simplement une famille hétérogène de corps, figurant non loin des graisses, et jouant un rôle déterminé dans certains phénomènes élémentaires. Les lipoïdes sont, en effet, des constituants primaires de la cellule.

Actuellement, on classe les lipoïdes, à côté des graisses et des cires, dans le groupe des *lipides*.

Les lipides. — D'après Polonowski et Lespagnol, on désigne sous le nom de lipides des éthers-sels comprenant les matières grasses et tous les esters qui possèdent des propriétés analogues.

On les divise en lipides ternaires et lipides complexes. Les premiers ne renferment que carbone, hydrogène et oxygène, et sont eux-mêmes subdivisés suivant la nature des alcools estérifiés, en :

- 1^o *Glycérides*, constitués par les esters du glycérol. Ce sont les graisses ordinaires ;
- 2^o *Cérides*, esters d'alcools supérieurs et d'acides gras de poids moléculaires élevés (cires) ;
- 3^o *Etholides*, résultant de l'union de plusieurs molécules d'acides-alcools s'estérifiant réciproquement par leurs oxhydriles ou leurs carboxyles (étholides des cires de Conifères) ;
- 4^o *Stérides*, lipides dans lesquels l'alcool est un *stérol* estérifié par un acide gras.

Les *lipides complexes* comprennent soit du phosphore, soit de l'azote, ou ces deux éléments. On les divise en :

- 1^o *Phospholipides*, renfermant du phosphore sous forme de radical phosphorique ;
- 2^o *Phospho-aminolipides*, comprenant, en outre, un reste aminé, et divisés en :
 - a) *Glycérophosphoaminolipides*, dont l'alcool est le glycérol ;
 - b) *Sphingophosphoaminolipides*, dont l'alcool est la sphingosine.
- 3^o *Galactolipides*, qui sont des cérébrosides ou galactosides.

Nous donnerons un bref aperçu de deux groupes plus particulièrement intéressants à considérer ici, le groupe des lipides complexes et celui des stérides.

A. *Les lipides complexes* ne sont pas tous également bien connus. Les phospho-aminolipides, cependant, ont été assez bien

étudiés. Ils existent dans toute cellule animale ou végétale. Le cerveau en renferme 20 %, le jaune d'œuf, 10 %. Ils sont solubles dans la majorité des solvants organiques, à l'exception de l'acétone, propriété mise à profit pour les séparer des lipides ternaires. Par leur présence, ils modifient considérablement la solubilité de beaucoup d'autres corps. Ils se décomposent facilement et s'oxydent à l'air. Avec les chlorures de cadmium et de platine, ils donnent des précipités bien caractérisés.

Leur hydrolyse fournit de l'acide phosphorique, un acide gras, une base (qui peut être de la colamine, de la sphingosine ou de la choline), et un alcool.

Les seuls phosphoaminolipides, dont l'existence soit certaine, sont : la lécithine, la céphaline et la sphingomyéline.

1° LÉCITHINES : ce mot doit être considéré comme désignant un ensemble de composés constitués par les esters de la choline et de l'acide glycérophosphorique (α ou β) diacylé.

L'hydrolyse d'une lécithine *biologiquement définie* conduit à l'obtention d'acides gras caractéristiques (palmitique, stéarique, oléique, linoléique, linolénique, arachidonique).

Les lécithines se décomposent à 110°, sont solubles dans les solvants organiques, *sauf l'acétone*, ainsi que dans les solutions aqueuses de sels biliaires. Cependant, l'acétone tenant en solution des graisses ou des acides gras en dissout une partie. Elles s'oxydent facilement, grâce à leurs fonctions éthyléniques. Elles donnent avec l'eau une liqueur opalescente, très stable, qui émulsionne les graisses.

2° CÉPHALINE : presque insoluble dans l'alcool. La colamine remplace la choline dans sa constitution.

3° SPHINGOMYÉLINE : se rencontre dans le tissu nerveux. Ici, la base est la sphingosine.

B. *Les stérols* se rattachent étroitement aux lipides, non seulement par leurs esters d'acides gras, les *stérides*, mais encore par la filiation biologique qui apparente ces alcools eux-mêmes aux corps gras.

L'importance biologique du noyau stérolique déjà consi-

dérable, par suite de sa diffusion dans les deux règnes animal et végétal et de ses rapports avec les acides biliaires, se trouve encore accrue depuis que l'on connaît les relations qui unissent l'ergostérol au facteur antirachitique (vitamine D). Les recherches récentes de Marrian, Doisy et Butenandt, sur les hormones sexuelles mâles et femelles, attribuent à ces composés la même structure fondamentale et rehaussent encore l'intérêt que les biochimistes accordent aujourd'hui à ce groupe de corps (Polonowski).

Parmi les stérols, un des corps les plus importants est le cholestérol.

Le cholestérol

$$\left[\alpha \right]_D^{15^\circ} = - 31.12 \text{ (dans l'éther).}$$

répond, classiquement, à la formule $C^{27}H^{46}O$. Il cristallise en aiguilles fusibles à 145° , est soluble dans l'éther, le chloroforme, le benzène, l'acétone, la pyridine.

En réalité, tout comme pour les lécithines, il s'agit plutôt d'un groupe de corps très voisins les uns des autres. On en connaît, déjà, au moins trois isomères :

- le β -cholestérol de Diels et Linn ;
- l'allocholestérol de Windaus ;
- le métacholestérol de Lifschütz ;

Des discussions se sont élevées au sujet de la structure de ces substances, structure extrêmement complexe (1) qui explique leur *qualité* biologique.

À côté de ces cholestérols, que l'on rencontre à l'état libre ou sous forme d'esters d'acides gras dans la plupart des tissus et humeurs de l'organisme, on a décrit des *phytostérols* et des *ergostérols*.

Le premier stérol isolé du règne végétal fut retiré de l'extract alcoolique des graines de pois (Beneke, 1802). On sait que l'on a pu obtenir une réaction de Wassermann

1. Cf. Wieland et Windaus, *Hoppeseyler's Zeitsch. für physiologische Chemie*, 213, p. 147.

positive avec un tel extrait employé comme antigène (réaction antilipoïdique banale).

IV. — Lipoïdes tissulaires et spécificité d'organe.

Tous les tissus renferment des lipoïdes, puisque ceux-ci sont des constituants permanents et fondamentaux du protoplasme cellulaire, mais, de plus, il semble actuellement bien établi que *ces lipoïdes sont quantitativement et qualitativement caractéristiques d'un tissu ou d'un organe déterminés, dans une même espèce zoologique.*

Rubow (1905) avait déjà montré que la lécithine existe en proportion invariable dans le cœur ou le rein.

Pour Erlandsen, Fraenkel, Iscovesco, d'autres encore, chaque tissu devait probablement posséder des lipoïdes spécifiques.

Il appartenait à A. Mayer et G. Schaeffer (1914) de donner à ces notions un peu vagues une base plus solide.

En procédant au dosage minutieux du cholestérol et des acides gras que renferment les organes de nombreux Homéothermes et Poïkilothermes, Mayer et Schaeffer parvinrent aux conclusions suivantes :

1^o La teneur en substances lipoïdiques d'un même tissu parenchymateux (foie, rein, poumon, pancréas) est sensiblement la même chez les individus d'une même espèce ;

2^o Le rapport $\frac{\text{cholestérol}}{\text{acides gras}}$ est assez caractéristique d'un organe donné (rapport lipocytique).

Cependant, il subsistait encore quelque obscurité quant à la nature et à la quantité des acides gras engagés dans la molécule complexe phosphatidique.

E.-F. Terroine et Jeanne Weill, Terroine et P. Belin (1927) précisèrent ce point si important, grâce à la notion de *l'élément constant lipidique*.

On savait — c'est une notion classique — que l'organisme peut mettre directement en réserve dans ses tissus, des

graisses alimentaires (Kuhne, Ledebef, Munk). Or, l'épuisement, à froid, d'un tissu par l'éther dissout ces graisses de réserve et laisse à peu près intacts les lipides de constitution, dont un nouvel épuisement par le benzène chaud permet d'évaluer l'importance (Pflüger-Dormeyer).

« L'organisme n'admet, dans l'intimité de ses protoplasmes, que des matériaux qu'une exacte transformation a dépouillés au préalable de leur caractère étranger, et si une partie de la graisse fixée peut échapper à cette loi, c'est uniquement celle qui n'a pas été véritablement associée à la vie des tissus, mais que l'organisme a simplement placée, comme combustible de réserve, à côté de ses protoplasmes. » (E. Lambling).

Par conséquent, les organes renferment deux catégories distinctes de lipides :

- 1^o les lipides de réserve, qui ne jouent aucun rôle dans le fonctionnement cellulaire, et qui sont des représentants, plus ou moins dégradés, des espèces animales ou végétales dont ils émanent ;
- 2^o les lipoïdes spécifiques, ou élément constant, qui subsistent seuls dans les tissus des animaux morts d'inanition, les réserves ayant été totalement utilisées.

Les premiers sont caractérisés par un indice d'iode bas, les seconds par un indice d'iode élevé. C'est là un fait de grande importance. Les recherches de Leathes et surtout celles de Hartley avaient déjà attiré l'attention sur les acides gras non saturés, à une ou plusieurs liaisons éthyléniques, corps dont le rôle biologique doit être considérable.

Les graisses de dépôt sont, en effet, constituées par un mélange de glycérides, d'acides saturés et d'acide oléique, présentant pour ses acides gras un indice de 60. Or, celui du muscle, par exemple, se situe autour de 160 chez l'animal inanité, ne renfermant, par conséquent, que des lipoïdes de constitution.

Si l'on poursuit lentement l'extraction par l'éther des matières grasses d'un organe déterminé, celles que l'on obtient

au début, présentent les caractères des graisses de dépôt, celles qui restent ont un indice d'iode de plus en plus élevé, jusqu'à ce qu'il atteigne une constante caractéristique de cet organe.

Mayer et Schaeffer s'étaient étonnés de ce que le rapport $\frac{\text{acides gras}}{\text{P. lipoïdique}}$ ne fût que rarement voisin de celui que présente la lécithine : 18. Mais ces auteurs avaient tenu compte, dans leurs dosages, des acides gras totaux. Or, chez des animaux inanités, Terroine et Belin, ne dosant que des acides gras de l'élément constant, trouvent au contraire des chiffres toujours très rapprochés de celui de la lécithine.

Tous les tissus renfermeraient donc un même type de phosphoaminolipides, présentant la constitution de la lécithine.

Mais, ici, intervient une notion nouvelle, celle de la *nature* des acides gras introduits dans cette molécule, et cela nous amène à poser la question de la *qualité* des phosphoaminolipides et de leur spécificité tissulaire.

« Si, conformément à ce qu'ont montré Mayer et Schaeffer, la *teneur* en acide gras n'est pas caractéristique d'un tissu et varie avec l'espèce, par contre, la *nature* des acides gras engagés dans les combinaisons lipoïdiques, de ceux qui constituent l'élément constant, paraît être entièrement indépendante de l'espèce, chez les homéothermes, et caractéristiques du tissu considéré.

« Dans le foie, si nous admettons que toute lécithine renferme, en proportions égales, acides saturés et acides non saturés, les résultats observés s'expliqueraient fort bien par la présence de l'acide linolénique, mise en évidence par Hartley dans le tissu hépatique. En effet, l'indice d'iode de cet acide étant $27\frac{1}{4}$, s'il apporte une molécule, l'autre saturée ne fixant pas l'iode, l'indice théorique du mélange doit être de 137 (140 expérimentalement).

« Question plus complexe pour les acides gras de l'élément constant du muscle, lesquels présentent un indice d'iode de 160. Or, cet indice ne peut s'expliquer par la présence, à

côté d'un acide saturé, de l'acide linoléique qui ne donnerait que 137, ni d'un acide analogue, mais à 4 liaisons doubles, qui donnerait 185. La valeur observée ne pourrait-elle pas se comprendre en faisant appel à deux faits signalés par Levene et Simms : d'une part, on peut isoler des lécithines qui renferment 2 acides saturés et 2 acides non saturés différents ; d'autre part, certains de ces corps renferment un acide à 4 liaisons doubles correspondant à l'acide arachidique.

« Appliquons ces constatations au cas du muscle, en imaginant que les deux acides non saturés sont : l'un, l'acide linoléique ; l'autre, cet acide à 4 liaisons doubles correspondant à l'acide arachidique, ou, tout au moins, un acide très voisin comme nombre d'atomes de carbone. La somme des indices d'iode des acides non saturés serait de :

acide linoléique.....	274
acide X à 4 liaisons doubles, à 18 ou 20 atomes de C...	370
	644

L'indice d'iode moyen pour les 4 acides — 2 saturés et les 2 non saturés ci-dessus — serait donc de 161, et nous trouvons 160. »

E.-F. Terroine et P. Belin, à qui nous empruntons la citation précédente, concluent que tout tissu d'homéotherme pourrait être défini, indépendamment de l'espèce, par le taux de son phosphore lipoïdique et par la *nature* des acides gras engagés dans la molécule de ces lipoïdes qui constituent l'élément constant.

Ainsi se trouve sérieusement posée, à la suite de ces travaux de tout premier ordre, la question si importante — quant au fondement biologique de la réaction de Wassermann — de la spécificité chimique des tissus.

V. — Extraction des lipoïdes tissulaires.

C'est là une des questions les plus épineuses de la chimie biologique, car il est indispensable d'obtenir ces substances,

extrêmement fragiles, sans leur avoir fait subir de modifications par trop importantes, modifications qui exposent à étudier expérimentalement des produits qui n'ont plus qu'une très lointaine analogie avec les lipoïdes de la cellule vivante.

La précaution liminaire à observer est la stabilisation aussi rapide que possible des constituants de l'organe étudié. Trois procédés principaux peuvent être utilisés, dans ce but :

1^o Traitement direct des tissus frais par un solvant tel que l'éther ou l'acétone anhydres. Il faut évidemment employer, dans ce cas, un excès important de solvant et une substance très divisée.

2^o Dessiccation rapide dans le vide, à basse température, en présence d'acide sulfurique concentré, de potasse caustique, etc.

3^o Fixation des tissus par l'alcool faible, décantation et dessiccation.

Pour juger du mérite respectif de ces trois procédés, il est nécessaire de ne pas perdre de vue les principes suivants :

a) Les tissus s'autolysent, après la mort, avec une rapidité qui peut être considérable (1/4 d'heure, pour la rate).

b) L'hydrolyse spontanée, l'autoxydation des acides gras non saturés, avec formation d'hydroxyacides, sont toujours à craindre (Farrion).

c) L'alcool dégage le lipoïde de sa liaison protéidique.

d) La phase aqueuse peut tenir en solution un taux fort élevé de lipides. Nous n'en voulons pour preuve que le sérum sanguin qui renferme, quoique optiquement vide, une proportion, qui peut être considérable, de substances lipidiques.

e) Un solvant-type des lipoïdes comme l'éther, employé seul, n'extraît rien ou presque rien d'un sérum riche en lipoïdes, tandis que le mélange alcool-éther extrait la presque totalité de ces substances (Hardy et Gardner, 1910 ; E. G. Young, 1922).

Nous avons abordé l'étude chimique des lipoïdes myocar-

diques et hépatiques de quelques Mammifères, afin de connaître le rôle que peuvent jouer leurs différents constituants dans la réaction de Wassermann. Nous avons procédé de la façon suivante :

1^o *Obtention d'une poudre d'organe.* — Aussitôt après la mort de l'animal, l'organe prélevé — ou mieux, une partie de cet organe soigneusement débarrassée de la graisse, des aponévroses, etc. — est finement pulpée à la machine. La pulpe est desséchée, dans le vide, à une température de 10 à 15°, en présence de potasse caustique ; il faut que la pulpe soit en couche aussi mince que possible, et fréquemment brassée. La dessiccation doit être poussée très loin. La durée de l'opération dépend de la nature de l'organe et de la technique employée. Plusieurs jours sont nécessaires pour obtenir une substance bien sèche. On la passe alors au broyeur fin et on continue l'opération de dessiccation pendant un jour ou deux, en renouvelant souvent la couche superficielle. On met enfin la poudre ainsi obtenue en ampoules, dans lesquelles on fait le vide, et que l'on conserve au réfrigérateur à 0°.

Une telle poudre peut servir soit au dosage des lipides, soit à l'extraction fractionnée de ceux-ci.

2^o *Dosage des lipides.* — La méthode de base est celle de Kumagawa-Suto, modifiée par Lemeland. Nous avons employé la variante proposée par P. Belin.

Saponification indirecte, après extraction alcoolique. Extraire à l'appareil de Kumagawa, pendant 8 heures, par l'alcool à 95°. Transvaser dans un ballon de 500 cmc., évaporer à faible volume. Introduire alors 50 cmc. de KOH alcoolique 2*n*. On traite au réfrigérant à reflux et on ajoute 45 à 50 cmc. d'eau. On réchauffe un quart d'heure, puis on laisse refroidir.

Transvaser la solution alcaline hydro-alcoolique dans une ampoule à décantation de 500 à 1000 cmc. Le ballon est rincé avec la solution alcoolique à 50°. On extrait trois fois par l'éther de pétrole (50°-70°). Les extraits étherés sont lavés avec 70 cmc.

d'eau légèrement alcaline et le liquide de lavage est réuni à la phase hydro-alcoolique. Cette solution est acidifiée par 10 cmc. d'HCl concentré. Les acides gras libérés se trouvant dans une solution alcoolique dont le titre a été abaissé, par l'acide et l'eau, à 25°, passent facilement dans l'éther de pétrole à l'aide duquel on fait 2 ou 3 extractions.

Les extraits sont lavés à l'eau, pour enlever l'acide entraîné. On transvase dans un ballon de 500 cmc. on évapore à sec, en s'aidant du vide et en plongeant le ballon dans l'eau bouillante, pour chasser toute trace d'humidité. On reprend par 10 cmc. d'éther de pétrole sec, bouillant au-dessous de 50°. On laisse déposer les impuretés pendant quelques heures. On filtre sur amiante et sable dans un ballon de Soxhlet de 50 cmc. taré. On évapore, on sèche dans le vide à 50° pendant trois heures et on pèse.

Pour doser l'insaponifiable, il suffit de traiter les extraits étherés qui le renferment d'une manière identique. Sur cet insaponifiable, on détermine le cholestérol par la méthode de Windaus.

Dosage du cholestérol par la méthode de Windaus-Caminade. — Dissoudre l'insaponifiable dans 30 à 40 cmc. d'un mélange d'eau (18), alcool absolu (9) et acétone (13). Porter à l'ébullition et ajouter 5 cmc. d'une solution fraîchement préparée de digitonoside à 0,5 % dans le même solvant. Le complexe se dépose. On filtre sur entonnoir de Fosse, on lave à l'eau bouillante, sèche à 110 et pèse le précipité.

Poids du complexe $\times 0,2431 =$ poids du cholestérol.

Dosage du phosphore des phosphatides par la méthode de Fiske et Subbarow. — On précipite à l'état de phosphomolybdate, on réduit ce dernier par l'acide amino-1-naphtol-2-sulfonique-4, puis on compare la teinte obtenue avec celle d'une solution témoin.

En réalité, il faut faire alterner hydrolyses, saponifications, épuisements par l'éther de pétrole si l'on veut faire autre chose que doser les acides gras totaux. Il faudrait tenir compte, en effet, des corps suivants :

Graisses neutres,
Savons,
Phosphoaminolipides,
Esters du cholestérol,
Cholestérol libre,
Insaponifiable X (*X Substanzen* de Kumagawa).

Nous avons appliqué les méthodes précédentes à des

organes renfermant encore l'élément variable glycéridique (graisses de réserve) et à des organes qui n'en renfermaient plus (animaux inanitiés) ou qui en avaient été débarrassés par épuisement préalable à l'éther, comparativement avec l'acétone.

a) MYOCARDE. — Le myocarde, et le muscle en général, sont des tissus à faible concentration lipoidique. Le taux des lipoides est plus élevé dans les tissus parenchymateux. Par contre, tous les muscles — et le myocarde ne fait pas exception — sont des lieux de dépôt de substances grasses (Voit, Pflüger, Rübner, Bogdanof).

« La propriété du muscle de renfermer, chez le sujet normal, une certaine quantité de graisses de réserve ne lui est pas rigoureusement particulière ; elle est partagée par tous les organes, mais seul chez les Homéothermes il la possède parfois à un très haut degré » (E. F. Terroine et P. Belin).

Nous avons pu vérifier que les variations du taux des acides gras sont plus importantes dans le myocarde, où elles atteignent 25 %, que dans les autres viscères, où elles oscillent autour de 8 à 10 % chez les animaux jeunes.

Cependant, le myocarde, du fait de son fonctionnement continu, est moins encombré que les autres muscles par les graisses de réserve. L'indice d'iode y est toujours élevé et ne s'abaisse que lorsqu'il y a une infiltration grasse, en général chez des sujets âgés ou malades.

Teneur en eau : 78,7 %

Acides gras : 0,60 % du tissu frais

2,60 % en poids sec (Meyer et Schæffer)

2,72 % en poids sec (Terroine et Belin)

(Lapin inanitié)

Nous avons obtenu les chiffres suivants en partant d'une poudre myocardique de veau, avant et après épuisement complet par l'éther anhydre distillé sur le sodium et rigoureusement exempt d'alcool.

Avant épuisement		Après épuisement	
Acides gras	Cholestérol	Acides gras	Cholestérol
11,05	0,35	2,50	0,30
7,82	0,50	2,43	0,32
10,72	0,49	2,60	0,26
9,53	0,38	2,65	0,28

Selon la technique employée pour l'obtention de la poudre de myocarde, les chiffres du cholestérol, après épuisement par l'éther, sont très différents. Dans le tableau ci-dessus, presque tout le cholestérol est à l'état d'esters ; dans d'autres cas, l'hydrolyse plus marquée en libère des quantités importantes.

b) FOIE. — D'après Terroine, chez l'animal inanitié la moyenne des acides gras hépatiques est de 1,95 % du tissu frais. D'après Mayer et Schaeffer, ils avoisinent 10 à 12, et le cholestérol total se situe autour de 0,75 (en % du poids sec) chez l'animal normal.

c) CERVEAU. — Il n'y a pas de lipides de réserve dans le cerveau. Qu'il s'agisse d'un sujet normal ou inanitié, la variation quantitative des lipides est de l'ordre des erreurs expérimentales. Par conséquent, ni la composition quantitative du cerveau, ni la nature de ses lipides ne dépendent de l'alimentation (Terroine et Belin).

3° *Extraction fractionnée.* — Seule, l'extraction fractionnée permet d'obtenir les substances lipoïdiques à un état de pureté, et surtout de conservation, assez prononcé pour permettre une caractérisation biologique satisfaisante.

Une telle extraction « par étages » représente une analyse très délicate des diverses catégories de lipoïdes, mais elle ne peut être conduite utilement que si l'on se conforme à quelques règles précises.

Ces règles ont été particulièrement bien mises en évidence par Machebœuf et ses collaborateurs, dans leurs travaux sur les substances lipidiques du bacille tuberculeux.

Ces expérimentateurs ont imaginé un appareil à lixiviation

tion continue dans le vide avec des solvants refroidis (1). On sait, en effet, que les lipoïdes se dégradent avec une grande facilité en présence de l'oxygène. Dans un appareil de ce genre, le solvant en contact avec la matière à épuiser se renouvelle, pendant une journée, une quinzaine de fois par siphonnage. L'opération peut être ainsi poursuivie pendant des semaines, et l'on imagine que, par ce procédé, l'extraction — pour un solvant et une température déterminés — est aussi complète que possible.

Par cette méthode générale, Machebœuf, Dieryck et Stoop ont fait de fort intéressantes constatations concernant la fraction haptène des lipoïdes du bacille de Kock, constatations que nous avons pu, de notre côté, vérifier quant aux lipoïdes de l'antigène de Wassermann.

D'abord, la nécessité d'opérer à une température atteignant au plus 15° est incontestable, car les solvants les plus spécifiques d'une fraction donnée dissolvent toujours une partie des autres fractions lorsque la température n'est pas assez basse.

Ensuite, l'ordre dans lequel on fait agir les solvants a une grande importance. En réalité, il n'y a pas de solvants rigoureusement *neutres*. L'action de ces corps ne se borne pas à une simple dissolution : il y a action chimique, ou action physico-chimique, autre que ce dernier phénomène. Cette action accessoire est en général faible, mais peut n'être pas négligeable.

a) FRACTION ACÉTONIQUE. — L'acétone ne dissout pas les phosphoaminolipides, mais à condition : 1^o) que la température soit inférieure à $+ 20^{\circ}$; au-dessous de $+ 15^{\circ}$, la lixiviation peut être poursuivie sans interruption pendant des semaines, sans que des quantités appréciables de substances phosphorées soient entraînées ; 2^o) que l'acétone ne tienne pas en solution des glycérides. Par conséquent, il faut renouveler l'acétone assez souvent au début de l'opération.

1. M. Machebœuf et N. Fethké. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 16, 1934, p. 229.

b) FRACTION ÉTHÉRIQUE. — L'éther est le solvant-type des lipoïdes, mais des lipoïdes libres. Il n'extraît rien, ou presque rien, des lipoïdes tissulaires de l'élément constant, quand ceux-ci ont conservé intacte leur liaison protéidique. Par contre, il dissout parfaitement les glycérides de réserve.

Agissant après une extraction acétonique très poussée, l'éther dissout encore d'abondantes substances non phosphorées.

L'éther devient capable d'extraire des lipides tissulaires : 1^o quand il est additionné d'alcool ; 2^o quand son action succède à celle de l'alcool ; 3^o en présence de certaines substances et dans des conditions encore mal déterminées (oléate de soude, etc.).

L'extraction par l'éther des lipides du sérum sanguin, en présence de quantités croissantes d'alcool, a été bien étudiée par Machebœuf et Sandor. Nous ne pouvons nous étendre, ici, sur ces recherches. Mais nous tenions à les signaler parce qu'elles montrent bien que les solvants ne jouent pas un simple rôle de dissolution.

c) FRACTION ALCOOLIQUE. — A froid et dans le vide, l'alcool éthylique succédant à un épuisement, prolongé pendant des semaines, par l'acétone, puis par l'éther, extrait d'abondantes substances phosphorées, c'est-à-dire une partie importante de l'élément constant. *Or, cette fraction seulement est investie de la fonction haptène.* Machebœuf et ses collaborateurs ont bien vu ce fait, en ce qui concerne les lipoïdes du bacille tuberculeux, et nous l'avons vérifié en étudiant les diverses fractions des lipoïdes du myocarde de Veau, dans leurs rapports avec la réaction spécifique de Wassermann, en éliminant, bien entendu, les réactions banales de groupe.

Malgré un épuisement prolongé par l'acétone et l'éther, la fraction alcoolique renferme $\frac{1}{3}$ de substances phospholipidiques et $\frac{2}{3}$ de glucides et de complexes hydrosolubles dénués de tout pouvoir hapténique.

On se débarrasse d'une bonne partie de ces substances

quand on traite préalablement l'organe frais par l'alcool faible, avant toute dessiccation. C'est ce que font Bordet et Ruelens, dans la préparation de leur antigène.

L'état de dessiccation plus ou moins prononcé de la poudre d'organe, le titre de l'alcool souvent hydraté, la nature de cet alcool, éthylique ou méthylique, etc., ne sont pas sans influencer sur la composition de l'extrait alcoolique.

VI. — Constitution des antigènes syphilitiques.

L'étude qui précède, quelque rapide et superficielle qu'elle soit, permet cependant de tirer les conclusions pratiques suivantes :

1^o Les lipoides sont des substances à structure très complexe, possédant une certaine individualité biologique ;

2^o Ces substances sont extrêmement fragiles et peuvent perdre tout ou partie de leurs caractéristiques biochimiques au cours des manipulations d'extraction, même conduites avec ménagements ;

3^o Substances difficiles à extraire, difficiles à séparer les unes des autres par les procédés usuels de la chimie organique, il est nécessaire, si l'on veut poursuivre leur étude biologique et non pas seulement analyser leurs propriétés chimiques globales, de créer une technique qui leur soit particulièrement adaptée.

Ce premier stade franchi, il deviendra possible de mettre en évidence l'haptène ou le groupe d'haptènes auxquels correspondent l'anticorps ou le groupe d'anticorps du sérum des syphilitiques. Outre l'intérêt doctrinal de ces notions ainsi précisées, la réaction de Wassermann y gagnera énormément en sensibilité et en spécificité.

Les recherches que nous poursuivons actuellement sur ce sujet nous laissent entrevoir la possibilité de purifier considérablement les antigènes actuels.

Les auteurs qui se sont préoccupés d'établir un antigène

artificiel (Sachs, Desmoulière et d'autres) ont fait entrer dans sa composition :

- a) une lécithine, c'est-à-dire un phosphoaminolipide quelconque (ou un mélange de phosphoaminolipides) à spécificités indéterminées ;
- b) un savon, en général l'oléate de soude ;
- c) du cholestérol.

Il est évident, d'après ce que nous savons déjà, que ces produits qui ne possèdent qu'une spécificité de groupe, comme la lécithine d'œuf, n'ont aucune valeur antigénique réelle. Mais ces antigènes artificiels montrent bien qu'en dehors du phosphatide hapténique, un acide gras, sous la forme de savon soluble, est indispensable à la « présentation » physico-chimique convenable de l'antigène dilué dans la solution électrolytique.

Le problème est donc assez complexe, car il ne faut pas aller, au cours de la purification des antigènes, jusqu'à se débarrasser de certaines substances qui n'ont aucun caractère hapténique par elles-mêmes, mais jouent, néanmoins, un rôle fort important dans la réaction.

C'est le lieu de répéter, ici, ce que nous disions plus haut. à savoir qu'entre le principe de Bordet et sa réalisation pratique, il y a tout un ensemble de facteurs physico-chimiques qui ne sont probablement pas les mêmes d'une réaction à l'autre.

DEUXIÈME PARTIE

Les facteurs physico-chimiques de la réaction de Bordet-Wassermann.

CHAPITRE I

L'adsorption sélective.

Le mécanisme des réactions anticorps, malgré les travaux importants qui leur ont été consacrés, demeure encore fort obscur.

Quelle est la nature de la liaison entre antigène et anticorps, quels rapports affectent ces derniers avec l'élément fondamental du sérum que représente la molécule protéidique ? Mais, tout d'abord, l'anticorps existe-t-il en tant que substance chimiquement définie ? Est-ce une entité matérielle, ou ne serait-ce pas plutôt une propriété physico-chimique des albumines sériques ? Autant de questions vivement controversées et qui n'ont reçu, ni d'un côté ni de l'autre, de réponses appuyées sur des arguments ou des faits expérimentaux décisifs.

Cependant, les récents progrès réalisés dans le domaine de la chimie-physique du sérum sanguin laissent entrevoir le genre de solution que pourrait recevoir, dans un avenir rapproché, le problème des réactions anticorps.

Nous ne pouvons entrer ici dans des considérations théoriques qui déborderaient le cadre de ce travail, mais néan-

moins, il nous paraît utile de tenter une rapide révision des notions, actuellement en honneur, concernant le mécanisme de la réaction de Wassermann.

Nous avons donné au chapitre précédent les raisons pour lesquelles nous inclinons en faveur de la spécificité de cette réaction. Ici, nous envisagerons la façon dont cette spécificité se manifeste, son substratum physico-chimique. Ce sera donc une étude du premier temps de la réaction. Au second temps sera consacré le chapitre suivant, avec tous les développements que réclame l'exposé d'une question aussi importante, en pratique, que celle du test hémolytique de liberté ou de blocage de l'alexine.

Après un court exposé des principales théories classiques sur la fixation spécifique du complément, nous examinerons le comportement général des colloïdes et leurs interactions, auxquels nombre d'auteurs rattachent actuellement le mécanisme des réactions d'hémolyse. Nous en arriverons à poser la question de savoir si cette assimilation est parfaitement légitime, et nous serons ainsi amenés à nous demander si l'on ne pourrait pas, avec plus de raison, substituer au phénomène de floculation, dénué de toute spécificité, *l'adsorption sélective*, qui présente l'immense avantage de faire intervenir la notion d'*affinité chimique spécifique*.

•

I. — Les théories.

De nombreuses théories ont été édifiées dans le but d'expliquer les réactions anticorps en général (précipitation, agglutination, etc.) ou, plus particulièrement, la réaction de Bordet-Gengou et celle de Wassermann.

1^o *Théorie d'Ehrlich* (1891). — C'est Ehrlich qui, le premier, a tenté de donner une explication de la saturation d'une toxine par une antitoxine. Mais cette « schématisation stéréochimique purement verbale » (Vlès) fait appel à une terminologie (toxone, toxoïde, protoxine, deutérotoxine,

tritotoxine, épitoxine, etc.) qui lui retire tout caractère scientifique à proprement parler.

2^o *Théorie d'Arrhénius et Madsen* (1903). — Ces auteurs assimilent la réaction antigène-anticorps à la réaction d'un acide et d'une base faibles. Il se produit un état d'équilibre, défini par la loi d'action des masses, entre acide, base et sel. La combinaison de *l'acide borique* et de *l'ammoniaque* présenterait un parallélisme frappant avec la neutralisation des toxines hémolytiques par leurs anticorps spécifiques, ou encore avec la neutralisation de la toxine diphtérique par l'antitoxine correspondante. Ce serait une réaction bimoléculaire, incomplète et réversible.

$$\frac{(t) \times (A)}{(tA) \times (r)} = K$$

où t représente la molécule d'antigène, A celle de l'anticorps, tA le groupement anticorps-antigène, r un résidu complémentaire de A .

Comme on a $[tA] = [r]$
il vient $(t) \times (A) = K (tA)^2$

Cette explication physico-chimique rend compte de certaines particularités du phénomène, mais soulève cependant de nombreuses objections. Disons simplement, ici, qu'elle ne prévoit pas l'hétérogénéité du système et ne peut constituer qu'une représentation approchée d'une partie seulement de la réaction complexe antigène-anticorps. Au surplus, ce point de vue un peu particulier présente moins d'intérêt pour nous que celui auquel s'est placé Bordet.

Théorie de Bordet (1920). — Bordet s'est dégagé de toute considération de chimie minérale, pour ne retenir que les faits biologiques expérimentaux, mais sans pour cela tomber dans l'erreur inverse et faire du naturalisme.

« Les manifestations dues aux sérums se rapprochent des phénomènes colloïdaux ou, d'une façon plus générale, de ceux qui dépendent de *l'affinité de l'adsorption*. Ayant constaté,

d'autre part, que les globules rouges peuvent absorber des quantités très variables de sensibilisatrice ou d'alexine et que le mode de fixation de ces principes offre des particularités dont des expériences très simples sur l'adsorption des couleurs fournissent une image fidèle, cet auteur estima qu'il convenait de rechercher si, quels que fussent d'ailleurs l'antigène et l'anticorps étudiés, l'analogie probable avec les phénomènes commandés par l'adhésion moléculaire se traduirait régulièrement. » (1)

Bordet compare donc ces réactions aux phénomènes de teinture, et l'on a pu lui opposer l'objection que ceux-ci manquent de spécificité. Cette objection ne serait pas sans valeur s'il s'agissait ici d'autre chose que d'une simple comparaison. Il est évident que, pour l'Ecole belge, à l'adsorption fait suite une combinaison chimique qui, elle, serait spécifique.

Cette interprétation a le mérite de tenir compte des combinaisons en proportions variables, et explique à la fois le phénomène d'Ehrlich et celui de Danysz. Mais elle fait intervenir une conception très élémentaire de l'adsorption, qui est en réalité un phénomène fort complexe, et lui attribue une indifférence chimique très probablement erronée.

Nous ne ferons que citer la théorie de Nicolle (1920), celles de Hertzfeld et Klinger (1918), de Boissevain (1922), etc. Toutes ces théories peuvent être appliquées à la réaction de Wassermann envisagée comme une réaction anticorps. Si on lui dénie cette dernière qualité, seule peut lui être appliquée la théorie, actuellement classique, dite de la surfloculance des sérums syphilitiques.

Théorie de la surfloculance. — A la suite de Porges et Neubauer, Vernes a étudié comparativement le pouvoir flocculant du sérum humain normal et celui du sérum syphilitique, vis-à-vis de l'hydrate de fer colloïdal, du sulfocyanate ferrique, etc. Cet auteur a constaté qu'il n'y avait que des différences zonales entre les flocculations du sérum normal et

1. Bordet, *Traité de l'immunité dans les maladies infectieuses*. Paris, Masson, 1920.

du sérum syphilitique. Il lui est apparu que, dans ces conditions, celui-ci floculait déjà, alors que le premier ne floculait pas encore, et il a ainsi établi la notion de la *surfloclulance des sérums syphilitiques*.

Cette caractéristique des sérums syphilitiques serait liée à l'état très particulier de leurs *globulines*. Alors que, dans tout sérum normal, les globulines apparaissent, aux épreuves de cataphorèse, chargées électro-négativement, elles présentent, au contraire, des propriétés amphotères, ou même électro-positives, dans les sérums syphilitiques (Baumgartel, Epstein, Césari et Lévy-Brühl, Much et Embden).

Cet état électrostatique des globulines est donc, d'après cette théorie, responsable de leur floclulation en présence des colloïdes lipoidiques utilisés comme antigènes dans les séro-réactions. Cette floclulation est à peine amorcée, mais colle néanmoins l'alexine, dans les réactions d'hémolyse ; le phénomène se poursuit et parvient à son plus haut degré d'instabilité, en donnant naissance à un floclat plus ou moins net et abondant, au cours des réactions dites de floclulation.

Telle est, exposée dans ses grandes lignes, la théorie, actuellement classique, de la surfloclulance. Elle serait parfaite, si elle n'était fausse. Nous dirons, plus loin, pourquoi.

II. — Les interactions entre colloïdes.

Une solution colloïdale est une solution dans laquelle les molécules du corps dissous ne sont pas équidistantes, mais agminées par groupes. Ces groupes forment des micelles ou grains, plus ou moins volumineux, en équilibre au sein du solvant.

Il y a tous les intermédiaires entre la molécule et le grain ; il y a donc également tous les intermédiaires entre la solution moléculaire et la solution colloïdale, d'autant plus que les molécules peuvent être, pour leur part, de taille très différente. Des solutions à petites molécules, on atteint insensiblement les solutions micellaires, en passant par les solutions à grosses molécules. Ces dernières peuvent, d'ailleurs,

présenter certaines caractéristiques optiques des solutions colloïdales proprement dites.

Il n'existe donc pas de substances colloïdales, mais un *état colloïdal* de telle ou telle substance *par rapport à un solvant déterminé*.

Les particules colloïdales portent une charge électrique. Plusieurs hypothèses ont été émises pour en interpréter l'origine. Il semble, ainsi que l'a montré J. Perrin, que les particules adsorbent des ions du liquide intermicellaire, car l'électrophorèse montre que dans les liquides non ionisables (éther, benzène, sulfure de carbone), cette charge est le plus souvent insignifiante. Pour Duclaux, certaines micelles pourraient être assimilées à de grosses molécules d'électrolytes ionisées (1).

Cette charge électrique, de même signe, maintient les particules à distance les unes des autres, suivant le principe bien connu de l'électrostatique. On peut modifier expérimentalement le signe électrique d'un colloïde, le faire passer du positif au négatif et vice-versa. Si la neutralisation de la charge se produit (2), les particules ont tendance à se réunir et à flocculer.

On dit qu'un colloïde floccule, lorsque les micelles s'agglomèrent entre elles, en formant des flocons qui tombent plus ou moins vite, selon leur densité par rapport à celle de l'excipient. La floculation revêt des aspects extrêmement variables suivant la nature des substances et les conditions du phénomène. Toute une partie de la sérologie est basée sur l'observation des floculats.

On distingue deux grandes catégories de colloïdes :

- a) *les suspensoïdes*, ou colloïdes hydrophobes, *instables*, dans lesquels la phase dispersée est à l'état solide (colloïdes métalliques, etc.) ;

1. Nous ne pouvons entrer ici dans un exposé de la théorie électrolytique des colloïdes protidiques. Disons simplement que l'ionisation de la molécule globulinique cadre parfaitement avec l'hypothèse de l'adsorption sélective d'un haptène déterminé.

2. Il n'est pas nécessaire, d'ailleurs, de décharger complètement les grains pour les faire flocculer. Il suffit de descendre au-dessous d'une certaine charge-limite constituant le *potentiel critique*.

b) les *émulsoïdes*, ou colloïdes hydrophiles, *stables*, dans lesquels la phase dispersée peut être considérée comme liquide, ou, en tout cas, possède de fortes liaisons avec l'excipient. A ce groupe appartiennent la plupart des colloïdes naturels.

C'est la chimie-physique des émulsoïdes qui nous intéresse ici tout particulièrement. Nous allons très brièvement analyser l'action de deux émulsoïdes l'un sur l'autre, et l'action réciproque d'un émulsoïde et d'un suspensoïde, puisqu'on peut faire entrer un colloïde de ce type dans une réaction de floculation (1).

Nous ferons remarquer que les expériences, si démonstratives, de floculation d'un colloïde par un autre colloïde, invoquées par certains sérologistes, se rapportent surtout aux suspensoïdes.

A. ACTION RÉCIPROQUE DE DEUX SOLUTIONS COLLOÏDALES STABLES. — Dans certaines conditions, il se produit une précipitation par le mélange de deux émulsoïdes. La concentration en ions H^+ constitue le plus important des facteurs qui conditionnent cette précipitation.

Les conditions optima se trouvent réalisées lorsque le pH de l'excipient commun est situé entre les points iso-électriques respectifs des colloïdes en présence.

Dans ces conditions, l'un des émulsoïdes peut être à l'état d'anion, l'autre de cation. Il est donc possible que ce mélange donne lieu à la formation d'un complexe insoluble.

Même lorsque ces conditions sont réalisées, la floculation ne se produira que pour des proportions convenables. On ne l'observe pas si l'un ou l'autre des deux colloïdes est en grand excès.

Or, l'on sait l'extraordinaire latitude dans les proportions

1. La décharge des granules par un ion de signe inverse n'entre pas ici en ligne de compte. Il n'a jamais été possible d'obtenir une floculation spécifique à l'aide d'un électrolyte. Le léger décalage entre bandes de floculation provient très probablement de la liaison globulines-anticorps.

qu'offre la réaction antigène-sérum syphilitique. On peut faire varier la dilution de l'antigène de $1/5$ à $1/25.000$ et davantage : on obtient toujours une réaction positive.

D'autre part, dans cette vaste zone réactionnelle, aucun système zonal, pas de bandes, pas d'oscillations, mais un phénomène parfaitement continu.

Des faits de cet ordre ne font-ils pas penser davantage à un phénomène d'adsorption qu'à une interaction entre deux émulsionsoïdes ?

Ajoutons encore — nous en verrons l'importance plus loin — que, dans ce cas, le floculat est toujours formé du mélange des deux colloïdes.

B. ACTION RÉCIPROQUE D'UNE SOLUTION COLLOÏDALE STABLE ET D'UNE SOLUTION COLLOÏDALE INSTABLE. — Dans le cas du mélange de ces deux types de solutions colloïdales, il peut y avoir classiquement :

- 1^o Accroissement de stabilité de la solution instable ;
- 2^o Diminution de stabilité de cette solution ;
- 3^o Floculation réciproque des deux colloïdes.

L'accroissement de stabilité d'une solution instable par un émulsionsoïde a été très étudié. L'effet exercé par ce dernier a été qualifié d'*effet protecteur*. Un exemple de ce phénomène a été donné par Faraday, en ce qui concerne l'action anti-floculante de la gélatine sur les solutions colloïdales d'or. En réalité, cette action des émulsionsoïdes rentre dans le cadre général des actions *anti-sortie de phase*, dispersives ou solubilisantes, en opposition avec les actions floculantes, coagulantes ou insolubilisantes, exercées par des substances dont l'état physique n'est pas obligatoirement du type micellaire. Nous verrons, plus loin, un exemple de l'effet protecteur de l'haptène spécifique sur la substance indicatrice des réactions de floculation.

Mélangées dans des proportions convenables, il peut arriver qu'une solution colloïdale stable et une solution instable floculent mutuellement. Bien entendu, cette précipi-

tation ne se produit que pour des quantités de solutions colloïdales comprises entre certaines limites.

III. — Les lois de l'adsorption.

Du point de vue expérimental, on peut définir les phénomènes d'adsorption comme ceux dans lesquels se produit la fixation d'une substance gazeuse ou dissoute sur une autre substance solide ou liquide, sans qu'il y ait réaction chimique évidente, ou dissolution proprement dite (Boutaric).

En général, on donne comme exemples d'adsorption la décoloration des solutions colorées par le noir animal, ou la teinture de la soie par une matière colorante à l'état très dilué.

On a longtemps admis qu'à l'interface, la paroi d'une phase est capable de coller les molécules de l'autre, et que le phénomène s'arrête lorsqu'il existe une couche monomoléculaire complète. Cela peut être vrai dans certaines conditions expérimentales, mais il y a de nombreux types d'adsorption, et, en particulier, l'adsorption qui se manifeste au cours des procès biologiques est infiniment plus complexe.

L'adsorption présente les deux caractères suivants :

1^o L'intensité de l'adsorption dépend de la nature du corps adsorbant et du corps adsorbé. *L'affinité chimique*, entre l'un et l'autre, peut être des plus variable.

Exemple : Dans une même solution de bleu de méthylène, un même poids de diverses substances adsorbantes fixe les quantités suivantes de matière colorante :

Charbon de bois.....	1,5
Alumine.....	1,6
Suie.....	1,7
Ocre jaune.....	3 à 4
Noir animal.....	4 à 30
Charbon de sang.....	60

(D'après Freundlich).

2° La quantité de matière fixée est proportionnelle à la surface du corps adsorbant.

C'est dire que plus un corps sera divisé, plus son pouvoir adsorbant ira croissant. La surface d'un corps pulvérulent est très importante par rapport à celle du même poids de substance non divisée. Celle d'un corps à l'état colloïdal peut être considérable, suivant la taille des granules, et d'autant plus que celle-ci est plus ténue. C'est à la limite de la solution colloïdale proprement dite et de la solution moléculaire que cette surface prendra des valeurs stupéfiantes. Cela explique l'intensité de l'adsorption dans de telles solutions. Nous en verrons plus loin un exemple.

L'adsorption a été très étudiée dans le but d'en dégager le comportement général, mais on s'est heurté, dans cette recherche, au polymorphisme du phénomène, tenant, entre autres, à l'influence des actions physiques ou chimiques surajoutées. Néanmoins, on est parvenu à établir des lois très générales, et qui sont absolument caractéristiques de l'adsorption, quelle qu'elle soit.

Dans tout ce qui va suivre, nous aurons seulement en vue l'adsorption d'une *substance dissoute*.

1° *L'adsorption n'est pas un phénomène instantané. Sa limite n'est atteinte qu'au bout d'un temps essentiellement variable avec la nature des corps en présence, le degré de concentration, la température, etc.*

L'adsorption peut demander de quelques minutes à plusieurs semaines, avant d'atteindre la limite de saturation. Nous retrouvons ici l'importante notion de *vitesse*. Si nous admettons l'assimilation à une réaction bimoléculaire, l'équation donnant la vitesse en fonction de la concentration sera la suivante :

$$V = K C^2$$

où K est une constante traduisant l'*affinité chimique* des corps en présence.

En faisant varier la concentration, nous avons pour le rapport des vitesses :

$$\frac{V}{\bar{V}} = \left(\frac{C}{\bar{C}} \right)^2$$

EXEMPLE ; Un sérum syphilitique dilué au 1/8 donne une réaction + + + ; dilué au 1/32, une réaction +. Dans quelles limites devra varier la durée du premier temps de la réaction ?

Le rapport des concentrations est 4. Par conséquent, la durée de la réaction, dans le cas du sérum dilué au 1/32, sera 16 fois plus longue que dans le cas du sérum dilué au 1/8.

C'est là une notion dont on ne tient, en général, aucun compte en sérologie.

2° *L'adsorption est, dans certains cas typiques, réversible; dans nombre de cas, elle n'est pas réversible.*

L'adsorption biologique appartient à la seconde catégorie. Qu'il s'agisse de l'adsorption de la sensibilisatrice par les hématies, ou de celle de l'alexine par le complexe fixateur, la réaction n'a qu'un sens.

Il est facile de s'en assurer en ce qui concerne les hématies sensibilisées. Leur lavage prolongé au sérum physiologique n'entraîne pas de quantités appréciables de sensibilisatrice.

3° *L'adsorption est d'autant plus prononcée que la concentration de la substance adsorbée est plus faible.*

C'est la caractéristique majeure du phénomène de l'adsorption.

La quantité de substance a fixée (pour une quantité déterminée d'adsorbant) est une fonction parfaitement continue et croissante de sa concentration dans le milieu ambiant. La courbe représentative est une parabole.

A mesure que la concentration augmente, l'intensité du phénomène s'atténue.

Nous verrons, plus loin, les applications importantes de cette loi en sérologie (fixation de l'alexine).

La concentration $\frac{x}{M}$ (x substance fixée, M masse de l'ad-

sorbant) n'est pas proportionnelle à la concentration C dans le milieu ambiant.

S'il s'agissait d'un phénomène de dissolution vraie, $\frac{x}{M}$ serait proportionnel à C (loi de Henry).

S'il s'agissait d'un phénomène de combinaison chimique, on aurait $\frac{x}{M} = \text{Constante}$ (Loi de Proust et Dalton).

Voici un exemple numérique emprunté à Appleyard et Walker (fixation de l'acide picrique sur la soie).

Acide picrique x M = 1 kgr. de soie	C Concentration de la solution d'acide picrique (en gr./litre)	$\frac{x}{Mc}$
13	0,064	200
17	0,12	140
27	0,59	46
37	0,98	38
44	1,98	22
54	2,94	18
64	5,00	13
75	7,00	11

Pour une température déterminée (isotherme d'adsorption), le phénomène est bien représenté par la formule de Freundlich :

$$\frac{x}{M} = \alpha C^n$$

où α et n sont des constantes spécifiques des substances en réaction. La puissance n est inférieure à 1 et comprise entre 0,1 et 0,7.

4° L'adsorption est inversement proportionnelle à la température.

Cela ressort des recherches de Gibbs sur les phénomènes qui se produisent à l'interface de deux phases liquides.

En combinant les principes de la thermodynamique avec

les lois de la capillarité, Gibbs est arrivé à la formule suivante :

$$u = - \frac{c}{RT} \frac{d\sigma}{dC}$$

u quantité de substance adsorbée par unité de surface, C concentration ambiante, σ tension superficielle de la solution, T température absolue, R constante des gaz.

Cette loi est extrêmement importante en sérologie. Elle peut s'exprimer ainsi :

La fixation de l'alexine est d'autant plus intense que la température est plus basse.

Elle se manifeste également, au second temps de la réaction, par l'accentuation des hémolyses incomplètes au sortir de l'étuve, à cause du refroidissement des tubes.

5° *Les corps qui abaissent la tension superficielle $\left(\frac{d\sigma}{dC} \text{ négatif}\right)$ s'adsorbent d'autant plus qu'ils abaissent celle-ci plus fortement.*

C'est une conséquence de la formule de Gibbs, qui joue également un rôle important dans le mécanisme des séro-réactions.

Nous verrons, lorsque nous envisagerons le rôle de l'adsorption dans les réactions anticorps, que les antigènes abaissent fortement la tension superficielle et s'adsorbent, de ce fait, avec intensité.

Adsorption, affinité chimique et réactions anticorps.

La théorie, actuellement classique, des séro-réactions fait appel à une interaction entre colloïdes, suivie de floculation. Dans le cas des réactions d'hémolyse, le flocculat naissant s'enrobe d'alexine et la fixe. Celle-ci s'oppose, d'ailleurs, à cause de son pouvoir dispersif, à la progression de la floculation. Dans le cas des réactions colloïdales proprement dites, la floculation se poursuit et devient la caractéristique essentielle de ces méthodes.

Il est curieux de constater que cette théorie, qui a conquis l'ensemble des sérologistes, ne repose sur aucune base sérieuse. Qui plus est, elle a contre elle de très nombreux faits expérimentaux, et nous ajouterions même, si nous nous le permettions, le simple bon sens.

En effet, elle fait reposer la réaction de Wassermann qui, bien exécutée, présente une remarquable spécificité, sur un phénomène physico-chimique qui est, lui, complètement dépourvu de spécificité. D'autre part, elle classe la syphilis, maladie essentiellement parasitaire, dans une catégorie hors cadres, caractérisée par un état particulier électrostatique des globulines du plasma sanguin.

Au milieu, donc, de toutes les affections microbiennes, dont le diagnostic peut être établi à l'aide d'une réaction de Bordet-Gengou, la syphilis ne saurait occuper sa propre place. Elle ressortirait à un processus, isolé en pathologie, et caractérisé par cet étonnant « état électrostatique spécial des globulines ». Sous le vague de cette formule, se distingue le souci d'harmoniser les faits avec une idée préconçue.

Demanche, dans la récente réédition de son *Précis de Sérologie*, expose cette théorie avec quelque prudence, et la fait suivre des considérations suivantes :

« Le mécanisme exclusivement physique que nous venons d'analyser suffit-il à expliquer entièrement les réactions sérologiques de la syphilis ? Il ne tient compte que de l'état colloïdal de l'antigène et de sa charge électrique et nullement de sa constitution chimique. Or, c'est un fait remarquable que, seuls, les antigènes préparés avec des lipoïdes, organiques extraits des tissus animaux, se sont montrés pratiquement spécifiques. Les antigènes artificiels, composés avec des lipoïdes synthétiques, des savons de soude ou des résines, n'ont jamais donné de résultats satisfaisants. Il y a donc aussi dans les réactions de la syphilis, comme dans les réactions vraies d'antigène à anticorps, un élément qualitatif qui assure leur spécificité. »

Les réactions de la syphilis sont bien des réactions vraies d'an-

tigène à anticorps, dont le mécanisme n'a rien à voir avec les interactions entre colloïdes. C'est ce que nous allons nous efforcer de montrer dans les lignes qui suivent.

A. Le sérum sanguin n'est pas une solution colloïdale, mais une solution moléculaire vraie.

Il y a quelques années, la conception colloïdale de l'état physique des protéines du sérum sanguin et, d'une façon générale, de toutes les albumines de l'organisme, était très répandue. Quelques auteurs, à vrai dire, avaient signalé des observations aberrantes. C'est ainsi que Mac Clendon et Prendergast, en 1919, en examinant une solution d'ovalbumine cristallisée, préparée par le procédé de Sørensen, avaient trouvé celle-ci optiquement vide à l'ultra-microscope et sans granules colloïdaux.

Bottazzi n'avait pu, de son côté, observer de particules dans une méthémoglobine purifiée et dialysée pendant plusieurs mois.

En tenant compte du degré de résolution des instruments d'optique, on pouvait en conclure que ces substances se présentaient comme *amicroniques*, c'est-à-dire comme plus voisines des solutions moléculaires vraies que des colloïdes.

Mais il fallut en arriver aux remarquables travaux de Lecomte du Noüy pour voir donner à ces présomptions force de fait scientifiquement et définitivement établi.

Dans une série de recherches de haute chimie-physique, répartie sur plusieurs années, cet auteur a minutieusement étudié les caractéristiques du sérum, à l'état frais et après chauffage à la température critique de 56°.

Voici quelques conclusions de Lecomte du Noüy :

« 1° Les protéines du sérum subissent une hydratation quand la température s'élève et cette hydratation ne devient irréversible que lorsque la température dépasse 55°, pour les chauffages de l'ordre de dix minutes. Il est probable qu'une hydratation préalable et réversible commence vers 45°.

« 2° A 56°-57° un minimum absolu de la viscosité est atteint, lequel correspond apparemment au début du phénomène

irréversible. Au-dessus de 57° la viscosité augmente rapidement.

«3° La fixation d'eau a pour effet d'accroître les dimensions des molécules dont le volume augmente régulièrement à partir de 55° pour dix minutes de chauffage. Pour des temps de chauffage plus longs, les courbes représentant l'augmentation de volume et l'accroissement de pouvoir rotatoire en fonction de la température sont décalées, parallèlement à elles-mêmes, vers les températures plus basses.

«4° Pendant le chauffage l'anisotropie optique des molécules est modifiée et augmente régulièrement. Les courbes exprimant le facteur de dépolarisation en fonction de la température ont une allure logarithmique.

« L'analyse des faits expérimentaux précédents, ainsi que d'autres plus anciens, conduit aux conséquences suivantes :

« a) *Le sérum est une solution vraie et non pas une solution colloïdale au sens d'agrégats de molécules.*

« b) La dispersion moléculaire ne varie pas au cours du chauffage, jusques et y compris la coagulation. Ceci a été confirmé dernièrement par Boutaric. *Il ne se produit pas d'agrégats quand on chauffe*, puisque le nombre de molécules reste constant dans les limites de l'expérience, aux erreurs expérimentales près.

« c) Tout se passe comme si l'hydratation irréversible des molécules de protéines du sérum se produisait à l'intérieur et non, comme on l'a cru jusqu'ici, à l'extérieur de la molécule. Les molécules d'eau pénètrent probablement entre les branches ramifiées formées par les amino-acides et les forcent à s'écarter, augmentant ainsi le volume total. La nature de la fixation de l'eau est encore inconnue et fait actuellement l'objet de recherches dans mon laboratoire. Cette hypothèse n'est pas en contradiction avec la théorie de Debye-Hückel (périssphère d'eau adsorbée), car cette théorie n'est valable que pour des molécules d'eau assimilables à des sphères et à charge électrique ponctuelle. Or, ni l'une ni l'autre de ces conditions n'est applicable aux molécules des

protéines, qui sont asymétriques et composées d'amino-acides échafaudés les uns sur les autres.»

Ainsi, le sérum est une solution moléculaire vraie, avant et après chauffage à 56°, *et non une solution colloïdale.*

L'extrait alcoolique de Bordet-Ruelens, soigneusement privé de cholestérine et fortement dilué, est une solution à grosses molécules, ainsi qu'il ressort des expériences que nous avons en cours, *et non une solution colloïdale.*

Il ne saurait donc y avoir de réaction du type colloïdal entre ces deux solutions. Il faut chercher autre chose.

B. *Le phénomène en cause, au cours du 1^{er} temps de la réaction, est celui d'une adsorption de l'antigène sur les globulines.*

Lorsque l'on met en présence du sérum syphilitique avec des solutions diluées d'antigène, de titre décroissant, celles-ci s'appauvrissent en antigène *conformément à la loi de Freundlich.*

Nous avons vérifié cette loi à l'aide de mesures photométriques, en évaluant la richesse résiduelle en antigène par l'effet dispersif sur un émulseide de cholestérol (1).

La courbe parabolique obtenue est tout à fait régulière et caractéristique de l'adsorption. Elle est comparable à celle que l'on obtient dans l'adsorption de l'acide picrique sur la soie.

Nous avons eu des réactions positives, c'est-à-dire une fixation de l'antigène, avec des dilutions extrêmement poussées, jusqu'à 1/25.000. Ce seul fait évoque un processus d'adsorption et s'inscrit nettement contre un phénomène de floculation.

Ici se pose une question importante : quel est l'élément constitutif du sérum sanguin qui adsorbe ainsi l'antigène ?

On peut répondre que ce sont les globulines, et cela pour les raisons suivantes :

De l'avis unanime des expérimentateurs, la réactivité des

1. Nous ne nous étendrons pas ici sur ces recherches qui feront l'objet d'un mémoire ultérieur.

sérums syphilitiques est liée à la fraction *globulines* des albumines sériques.

Si l'on précipite les globulines d'un sérum syphilitique, a) on n'obtient plus la réaction dans le liquide de centrifugation ; b) on obtient la réaction dans une solution des globulines redissoutes (Rubinstein).

Les auteurs qui ont précipité la totalité des globulines à l'aide de la dialyse (Kopaczewski, Kapsenberg), ou encore au moyen de l'électrodialyse (Stern) sont parvenus aux résultats les plus nets.

La précipitation incomplète par l'acide carbonique (Renaux, Salta et Donati, Mandelbaum) est beaucoup moins démonstrative.

Par précipitation fractionnée à l'aide de sulfate d'ammonium à des concentrations diverses, on isole (Hofmeister et ses élèves) des substances qualifiées de fibrino-globulines, euglobulines, pseudoglobulines. On a recherché si l'une de ces substances pouvait être considérée, plus particulièrement, comme le support de la réactivité des sérums syphilitiques.

Pour Ruppel, Weissbach et d'autres, seule l'*euglobuline* est en cause dans la réaction spécifique.

Mais la totale précipitation de ces fractions différentes nécessite des précautions qui n'ont pas toujours été observées, et cela explique les divergences entre certains résultats expérimentaux.

Retenons simplement que les globulines sont le support de la réactivité syphilitique.

C'est par conséquent sur elles que s'adsorbe l'antigène. *Ce fait est inexplicable si l'on fait intervenir quelque phénomène électrostatique. Il devient parfaitement compréhensible et rentre dans le cadre des phénomènes d'adsorption étudiés dans l'industrie, si l'on fait intervenir la notion d'affinité chimique.*

C. *La notion d'affinité chimique peut seule expliquer l'adsorption de l'antigène sur les globulines. Cette affinité pour l'antigène est due à la liaison des globulines avec une substance anticorps spécifique.*

Cette sensibilisation des globulines a déjà été soutenue par quelques auteurs, mais ceux-ci se sont égarés dans une théorie de la précipitation des globulines, théorie controuvée par les faits.

Meinicke avait émis l'hypothèse, à propos de ses premières réactions, que l'antigène se combine avec les anticorps du sérum, et par l'intermédiaire de ceux-ci, avec les globulines. Mais pour cet auteur, cette combinaison avait pour effet de modifier les caractéristiques colloïdales des globulines.

Wassermann, de son côté, chercha à isoler cette substance, combinée aux lipoides antigéniques dans le flocculat de la réaction de Sachs-Georgi. Il y serait même parvenu, mais le protocole de ses expériences appelle de sérieuses réserves, ainsi d'ailleurs que le rôle qu'il fait jouer à cette substance, dite de Wassermann.

Quoi qu'il en soit, pour Wassermann, Nicolau et Banciu, il existerait une substance anticorps spécifique, non pas du tréponème, mais des produits de désintégration tissulaire due à la maladie syphilitique. C'est là une conception à laquelle nous nous rallions entièrement, car elle seule fournit une explication satisfaisante de la spécificité des séro-réactions.

Cette sorte de mordantage des globulines par l'anticorps leur confère une *affinité* considérable pour l'haptène correspondant, *mais qui n'est pas nulle pour d'autres haptènes du même groupe chimique*. Il y a là une question de degré. Dans une solution *extrêmement diluée* de plusieurs haptènes différents, dont un seul est spécifique de l'anticorps, cet haptène-là sera adsorbé à l'exclusion des autres. Si l'affinité est intense (sérum fortement positif) et que l'antigène soit polyvalent, elle pourra « déborder » sur des groupes de lipoides assez éloignés : l'haptène spécifique ne sera pas seul adsorbé. *Plus la réactivité sera marquée, plus l'affinité s'élargira et englobera des lipoides de plus en plus éloignées de l'antigène vrai*. Ce fait n'est pas isolé en biologie. Le phénomène de l'agglutination en est un autre exemple. On sait que l'agglutination, par un sérum de malade, du para A, du para B et de l'Eberth peut être également marquée au 1/20, au 1/30, au

1/50. Il est nécessaire de pousser les dilutions beaucoup plus loin, pour dégager *l'agglutination prédominante*, qui seule est spécifique. Il en est absolument de même du phénomène de l'adsorption de l'antigène spécifique. On ne met en évidence l'affinité réelle, on ne la caractérise vraiment qu'à l'aide de solutions antigéniques très diluées.

Il existe donc un seuil d'adsorption qui, pour l'haptène spécifique, est très bas situé. *Il faut descendre au niveau de ce seuil, si l'on veut se débarrasser de l'adsorption non spécifique.* Si, au contraire, on s'élève au-dessus de ce seuil, on finit, dans le cas de fortes réactivités, par faire adsorber aux globulines sensibilisées n'importe quels lipoïdes. C'est ce qui explique les réactions de fixation obtenues à l'aide d'extraits végétaux et animaux les plus variés, et qui ont été invoquées contre la spécificité de la réaction de Bordet-Wassermann. On n'a jamais entendu dire que l'agglutination au 1/5 d'un colibacille par un sérum de typhique ait pu faire proclamer la non-spécificité de l'épreuve de Widal.

Quelle est la nature de cette substance spécifique ? Il est difficile actuellement de le dire. Forssmann pense qu'il doit s'agir d'un lipoïde, mais non d'un véritable anticorps. Cette opinion s'appuie sur la réactivité de groupe. Nous avons dit plus haut ce que nous pensions de cette objection : l'effet de groupe est habituel aux anticorps, au-dessus d'un certain seuil antigénique.

Quand on considère les incroyables possibilités de synthèse chimique des êtres vivants, il faut un moindre acte de foi pour croire aux anticorps — substances à architecture déterminée — que pour attribuer des propriétés spécifiques, aussi constantes et nuancées, à un quelconque état électrostatique des protéines.

D. *L'alexine est collée par le complexe antigène-anticorps proportionnellement à la concentration de l'antigène sur l'adsorbant.*

La particularité que présente l'alexine d'être adsorbée par les complexes antigène-anticorps est à la base de la réaction de Bordet-Gengou.

Nous étudierons plus longuement l'alexine ailleurs (1). Nous signalerons néanmoins, ici, la discussion, toujours ouverte, sur la nature de cet agent : entité matérielle ou simple propriété physico-chimique des protéines sériques.

La première hypothèse est la seule qui nous paraisse cadrer avec les faits expérimentaux.

L'alexine se présente comme une substance susceptible de s'adsorber, et cela seul est la preuve de son existence réelle.

L'intensité du *collage* de l'alexine mesure la réactivité des sérums syphilitiques. L'antigène est, en effet, d'autant plus concentrée sur la molécule que l'affinité au niveau des globulines est plus grande, et plus la concentration de cet antigène périglobulinique est prononcée, plus l'alexine est fortement fixée.

Aussi, tout dispositif de réaction d'hémolyse doit être disposé de telle sorte qu'il permette d'apprécier la capacité de fixation des sérums syphilitiques pour l'alexine.

E. Dans les réactions dites de floculation, la floculation est un phénomène secondaire, qui a une simple valeur indicative et ne prend aucune part à la réaction proprement dite. L'adsorption sélective de l'antigène sur la molécule globulinique est le véritable phénomène spécifique.

Les réactions de floculation sont des variantes de la réaction de Bordet-Wassermann, dans lesquelles l'adsorption spécifique de l'haptène, au lieu d'être indiquée par le collage du complément et l'absence consécutive d'hémolyse, est révélée par la floculation d'une substance qui n'était maintenue en suspension que grâce à la présense de l'haptène. Celui-ci venant à être adsorbé et quittant la solution, son rôle dispersif disparaît et la substance-indicateur précipite.

Cette conception, on le voit, est fort éloignée de la théorie classique, laquelle va chercher son inspiration dans les interactions entre suspensoïdes électro-positifs et électro-négatifs : les granules différemment chargés copulent et, ne

possédant plus de charge électrostatique, tombent. L'assimilation, pour contestable qu'elle soit, a fait fortune. Les globulines syphilitiques, chargées positivement, floculeraient avec les antigènes sérologiques qui, eux, portent une charge négative.

Malheureusement, les faits expérimentaux s'inscrivent en faux contre cette séduisante théorie.

1^o Si la flocculation résultait d'une interaction entre colloïdes, on devrait pouvoir obtenir des réactions spécifiques à l'aide de divers colloïdes électro-négatifs.

Or, seuls ont donné des résultats satisfaisants les extraits de tissus organiques et, en particulier — nous ne saurions assez insister sur ce point — les extraits de myocarde (cœur humain, de Bœuf, de Cheval, de Veau, de Cobaye). Le cholestérol, le benjoin, le baume de Tolu ne sauraient, à eux seuls, donner lieu à une réaction spécifique : ils n'entrent dans celle-ci qu'à titre adjuvant.

Cette simple constatation met en singulière posture la théorie qui fait de l'antigène sérologique un simple vecteur d'électricité positive.

2^o Si la flocculation résultait d'une interaction entre colloïdes, le flocculat devrait être constitué par l'un et l'autre de ces colloïdes.

Or, le flocculat est exclusivement formé de l'un des constituants du réactif sérologique.

L'analyse du flocculat a été faite par de nombreux auteurs. Voici, d'après Demanche, les résultats de ces recherches.

Pour Tannenbergl, le flocculat est entièrement formé de lipoides ; il ne renferme aucune trace d'albumine. Cette conclusion découle de la recherche négative de l'azote par le procédé de Kjeldahl.

Bachmann confirme cette opinion en montrant, au moyen du réfractomètre de Zeiss, que la concentration en albumines d'un sérum syphilitique n'est pas modifiée du fait de la flocculation.

Mandelbaum, Dold, Scheer, Niederhoff, Epstein et Paul,

Nicolau et Banciu, Cesari parviennent, par des voies différentes, à la même conclusion.

Ces lipoïdes ne proviennent pas du sérum, *a*) parce que le volume et la composition du flocculat ne dépendent pas des variations du sérum, mais seulement de celles des extraits (Niederhoff, Bauer et Nyiri); *b*) parce que la proportion des lipoïdes sériques pouvant entrer dans la composition du flocculat n'est que de 0,07 % (Niederhoff).

Par conséquent, la composition du flocculat n'est pas celle que laissait prévoir la théorie classique, laquelle, sur ce point important, se trouve encore en défaut.

En réalité, ici comme dans la réaction de Wassermann, nous notons l'intervention d'un *facteur qualitatif* auquel la réaction de floculation est étroitement liée.

Analysons le mécanisme des réactions de floculation.

Le réactif antigénique est formé, en règle générale :

1^o de l'haptène spécifique (extrait myocardique).

2^o d'un indicateur précipitable (cholestérol, etc.).

Lorsque l'on dilue à l'aide d'une solution électrolytique (NaCl à 9 ‰ par exemple) une solution alcoolique d'un tel mélange, la précipitation de l'indicateur est évitée grâce au pouvoir disperseur de l'haptène. Il est facile de s'en assurer en opérant la dilution de chaque élément séparément. Si l'indicateur est du cholestérol, par exemple, il précipite nettement. Mélangé, au préalable, à l'haptène, il donne des solutions aqueuses qui peuvent être à peine opalescentes.

Or, nous savons que l'haptène est adsorbé par la molécule globulinique du sérum des syphilitiques. Dans ces conditions, l'indicateur ne peut que précipiter, puisque son disperseur a disparu de la solution dans laquelle il se trouve.

Cette précipitation revêt des aspects divers, selon la vitesse de l'adsorption hapténique, son intensité, les conditions physico-chimiques du milieu (titre de l'électrolyte, etc.).

On peut la rendre plus nette en *l'avancant*, c'est-à-dire en réglant la proportion entre haptène et indicateur à la limite de la précipitation et même à un état de précipitation fine tenant encore bien en suspension : la moindre diminution de

l'haptène amènera, dans ces conditions-limites, la précipitation totale (réactions d'éclaircissement de Meinicke).

Il arrive, lorsque l'indicateur est du cholestérol et que le sérum manifeste une intense réactivité, que l'affinité de groupe *s'étale* à un point tel que le cholestérol, tout comme l'haptène, se trouve également adsorbé. Il en résulte que la précipitation du cholestérol ne se produit pas, et que la réaction est négative à tort. Cette éventualité se présente parfois avec le Kahn. On sait, par ailleurs, que dans cette dernière réaction, les sérums faiblement positifs n'entraînent pas de floculation dans le 1^{er} tube, mais seulement à partir du 2^e, et parfois dans le 3^e seulement. Le fait est aisément explicable. Que l'on veuille bien se rappeler que l'adsorption est d'autant plus intense que la concentration est plus faible, et l'on comprendra qu'en cas de sérums faiblement positifs, la *proportion* d'haptène fixé sera plus grande dans le 3^e tube que dans le 2^e, et dans le 2^e que dans le 1^{er}. Il s'ensuit que la précipitation du cholestérol pourra ne se manifester que dans le 2^e, ou même seulement dans le 3^e tube.

Dans cette même réaction de Kahn, si l'on augmente graduellement la quantité d'antigène — la dose de sérum syphilitique restant fixe — l'intensité de la floculation ira d'abord en croissant, puis diminuera et finira par être nulle. Cela est facile à comprendre. Tant que la capacité de fixation pour l'haptène n'est pas dépassée, plus on ajoute de réactif, plus le précipité de cholestérol augmente. Au delà d'un maximum de fixation, il reste de l'haptène libre, et cette proportion d'haptène libre allant en augmentant au fur et à mesure de l'introduction de nouvelles quantités de réactif antigénique, elle devient à un moment donné suffisante pour empêcher toute précipitation du cholestérol. La réaction est négativée par excès d'« antigène ».

Comme on voit, il s'agit là de tout autre chose que d'un *phénomène de zone*, explication que l'on donne classiquement de cette expérience.

Dans toutes ces réactions, dites de floculation, la précipitation de l'indicateur est due à *l'adsorption sélective de l'anti-*

gène sur la molécule globulinique. C'est le mécanisme même de la réaction de Bordet-Wassermann. Aussi, après centrifugation de l'indicateur précipité, suffit-il d'ajouter de l'alexine pour constituer une réaction d'hémolyse type. C'est ce que font Dujarric de la Rivière et Gallerand, qui combinent ainsi les deux réactions.

Il y a donc une identité foncière entre les réactions d'hémolyse et les réactions de floculation, mais pas dans le sens qu'il est convenu d'adopter classiquement. *La floculation ne joue aucun rôle spécifique, ni dans les unes, ni dans les autres, et ne saurait en aucune façon constituer entre elles un lien. Elle n'est que le simple phénomène indicateur des secondes, comme l'absence d'hémolyse est le phénomène indicateur des premières.*

Le lien réel entre ces deux groupes de réactions, le phénomène qui leur est commun, est l'adsorption sélective de l'antigène sur la molécule globulinique sensibilisée par l'anticorps. Les réactions de floculation ne sont donc qu'une variante de la réaction-type de Bordet-Gengou. Ainsi s'explique leur spécificité qui, pour le Kahn, est extrêmement élevée, spécificité dont ne pouvait rendre compte un phénomène aussi dépourvu de spécificité que la floculation d'un colloïde par un autre colloïde.

Controvée par tous les faits expérimentaux, la théorie de la floculation doit être abandonnée. L'étude du mécanisme physico-chimique de la réaction de Bordet-Wassermann, comme celle du mécanisme physico-chimique des réactions dites de floculation, met en pleine lumière le rôle de l'adsorption sélective et substitue à de vagues considérations électrostatiques, la notion infiniment plus féconde d'affinité chimique spécifique.

CHAPITRE II

Le test hémolytique.

I. — L'hémolyse.

L'hématie. — L'hématie doit à sa structure particulière et au pouvoir colorant de la substance qui l'imprègne, d'être un réactif sensible et pratique de certaines modifications physico-chimiques du milieu dans lequel elle se trouve.

Une hypothèse ancienne faisait de l'hématie une vésicule limitée par une membrane et renfermant une solution d'hémoglobine. La conception histologique moderne reconnaît au globule rouge la valeur d'une cellule sans noyau (1), ayant subi des modifications en rapport avec le rôle de vecteur d'oxygène qui lui est dévolu. Sa constitution fondamentale est donc voisine de celle de toute cellule vivante, et l'opinion que l'on peut avoir sur le comportement cellulaire, en général, est applicable au comportement globulaire, sous certaines réserves (2).

L'hématie présente les constituants suivants :

1° *Un stroma*, qui est l'ancien protoplasma cellulaire modifié,

1. Tout au moins chez les Mammifères. Les hématies des Vertébrés ovipares et des Invertébrés conservent, comme l'on sait, leur noyau.

2. L'hématie, cellule en général privée de noyau et ne se reproduisant pas, offre une *passivité* biologique très spéciale et *subira* des perturbations auxquelles une cellule ayant conservé son dynamisme pourrait, dans une certaine mesure, résister. Cette inertie du globule rouge des Vertébrés supérieurs ne fait, d'ailleurs, qu'accroître sa valeur comme système de référence physico-chimique. Compte tenu de légères différences selon l'âge, l'hématie possède un étalonnage constant.

limité par une couche condensée qui lui constitue une membrane et lui assure une forme déterminée à l'état de repos. Le globule rouge est moins riche en eau que les autres cellules (60 % au lieu de 70 %). En plus des matériaux protidiques, qui en forment comme la charpente, il renferme des graisses, de la lécithine, de la cholestérine, etc., substances de constitution ;

2° *L'hémoglobine*, qui entre pour 80 % du poids sec dans la composition du globule et résulte de l'union d'une histone (94 %) et de l'hémochromogène (4,5 %), c'est-à-dire d'une protéine et d'un pigment à noyau ferrugineux. Ce chromoprotéide serait : pour les uns, situé à l'état dissous dans les mailles du stroma, ce qui est infirmé par la solubilité très faible de l'hémoglobine (Hoppe-Seyler), bien que l'on puisse faire intervenir la sursaturation (Lambling) ; pour les autres, combiné au complexe lipoido-protéinique du stroma, ce qui paraît plus vraisemblable.

Le phénomène de la diffusion de l'hémoglobine. — Lorsque l'on vient, par exemple, à abaisser la tension osmotique du milieu ambiant au-dessous d'une valeur critique, l'hémoglobine quitte son support et diffuse dans le liquide interglobulaire qu'elle colore vivement en rouge. C'est le phénomène de l'hémolyse. Y a-t-il eu lésion globulaire, déchirure, ainsi que le soutiennent quelques auteurs ? Le fait n'est rien moins que démontré. Il est certain qu'un traumatisme de l'hématie provoque l'hémolyse, mais toute hémolyse ne s'accompagne pas obligatoirement d'une rupture, d'une solution de continuité dans le périplasme de l'hématie. On peut, d'ailleurs, faire réadsorber par celle-ci, dans certaines conditions expérimentales, une bonne partie de la substance colorante diffusée (Starlinger, Bayliss).

Les causes susceptibles de provoquer l'hémolyse sont extrêmement nombreuses. « On l'obtient avec l'eau distillée, l'urée, les sels ammoniacaux, les alcalis et les acides dilués, le sublimé, les alcools, l'éther, les aldéhydes, les acétones, les colloïdes inorganiques (silice colloïdale), les précipités

minéraux (sulfate de baryte fraîchement précipité), les glucosides (saponine, solanine, digitaline), les savons et notamment l'oléate de soude, la bile et les sels biliaires, les diastases (suc pancréatique), les toxines végétales (ricine, abrine), les hémolysines d'origine bactérienne ou animale (hémolysines des sérums, du venin des abeilles, des crapauds, des araignées, des serpents). » (Lambling).

L'hémolyse a été l'objet d'un nombre imposant de travaux. Ce phénomène, d'une immense portée scientifique, est régi par les lois fondamentales de la biochimie et de la biophysique. C'est assez dire qu'il est encore très mal connu. Nous ne l'étudierons, ici, qu'en fonction du rôle qu'il joue dans la réaction de Bordet, comme indicateur de la présence ou de l'absence d'alexine. Mais, auparavant, nous ne croyons pas inutile de donner une rapide vue d'ensemble sur les principaux procès hémolytiques.

L'hémolyse physique. — Le type en est fourni par l'hémolyse hypotonique, la plus anciennement étudiée. Le phénomène osmotique mis en évidence par De Vries sur la feuille de *Tradescantia* avait suggéré une théorie mécanique de l'hémolyse, dite de l'éclatement, contre laquelle se sont élevés nombre d'auteurs (Nolf, Stewart, Rollet, V. Henri). La conception moderne de Donnan sur l'équilibre de membrane et la tension osmotique des protéines, celle de Mayer et Schaeffer sur l'imbibition, permettent de se faire du phénomène une représentation plus satisfaisante.

D'après Mayer et Schaeffer, le début de l'hémolyse par hypotonie se manifeste, pour les hématies de différentes races animales, dans les solutions de chlorure de sodium présentant les concentrations suivantes :

Mouton.....	8,3 de NaCl ‰
Cheval.....	6,9 —
Porc.....	7,5 —
Lapin.....	6,3 —
Bœuf.....	6,3 —
Cobaye.....	6,3 —
Chien.....	6,3 —
Poule.....	4,5 —

Classiquement, les hématies de l'Homme commencent à hémolyser dans les solutions salées à partir et au-dessous de 4,5 ‰.

L'hémolyse physique peut être due, également, à une simple élévation de température ou, au contraire, à un abaissement de celle-ci (congélation). Il en est de même de l'exposition aux rayons ultra-violets, de la photosensibilisation, etc.

L'hémolyse chimique. — Diverses substances chimiques provoquent l'hémolyse *en milieu isotonique*. Certains glucosides comme la solanine, la digitonine, la cyclamine, la githagine, les saponines ont un pouvoir hémolytique intense. La saponine agit à une dilution inférieure au 1/125.000. On sait que le cholestérol protège les hématies contre l'action hémolytique de la saponine et que, d'autre part, la digitonine hémolyse les hématies en précipitant le cholestérol intra-globulaire (R. Fabre).

Parmi les substances à pouvoir hémolytique marqué en milieu isotonique, les acides gras et les savons nous intéressent, ici, tout particulièrement. Il est probable, en effet, que les acides gras jouent un rôle important dans l'hémolyse biologique. Mac Bain et ses collaborateurs ont montré que le palmitate de potassium possède une grande pression osmotique, et, en solution diluée, se comporte comme un électrolyte non colloïdal. Or les hématies ont un pouvoir adsorbant considérable pour ces corps, et, par conséquent, la propriété de les concentrer dans leur stroma. D'après Arrhénius, une simple solution de soude se trouverait, au bout d'un certain temps, à une concentration 800 à 900 fois plus grande dans les globules que dans le liquide périglobulaire. Au fur et à mesure de l'augmentation de la concentration intraglobulaire des savons, il se produit une colloïdisation de l'ion *acide gras*, par polymérisation et hydratation, faible pour les savons d'acides gras de petit poids moléculaire, importante pour les savons supérieurs, en C¹⁸ (stéarate de soude) ou en C²² (béhénate de soude). Il

s'ensuit une augmentation de la tension osmotique et une rupture d'équilibre. Les travaux de Donati et Satta, ceux de Belfanti, font intervenir une action chimique sur les lipoïdes globulaires. Mais cette théorie, qui laisse entrevoir une explication de la spécificité des hémolysines des antisérums, repose sur des bases fragiles.

Ici encore, le cholestérol possède des propriétés protectrices (Ransom, Iscovesco).

L'hémolyse biologique. — Depuis la découverte par Bordet, en 1897, d'une hémolysine chez le Lapin infecté par un streptocoque, on a caractérisé de nombreuses hémolysines naturelles microbiennes, végétales ou animales.

Les cultures de streptocoque (Besredka), de vibrions pseudo-cholériques (Krauss et Clairmont), de staphylocoques (Neisser et Weichsberg), de pneumocoque (Libmann, Rufus Cole), de bacille pesteux (Raybaud et Pélisier), de bactérie charbonneuse (Casagrandi, Heyrowski, Landsteiner), etc., peuvent renfermer des hémolysines plus ou moins actives.

Ce sont les hémolysines naturelles, végétales et animales, qui ont fourni les renseignements les plus intéressants sur l'hémolyse toxique.

L'abrine, isolée des graines d'*Abrus precatorius*, étudiée par Rehns; la *crotine*, extraite des graines de *Croton Tiglium*; la *phalline*, poison des Amanites mortelles (*Amanita phalloides*, *A. virosa*, *A. verna*), étudiée par Letellier, Kobert, W. Ford, renferment des hémolysines caractéristiques. Mais c'est surtout la *ricine* qui a été l'objet de travaux importants et a donné lieu aux expériences les plus suggestives.

Découverte par Buknow et Dixon, en 1889, dans les graines de *Ricinus communis*, la ricine est le type des phytotoxines. Elle possède la propriété antigène et permet de préparer un antisérum en présence duquel elle précipite (Ehrlich). Elle est agglutinante, à la dose d'un dix millionième, pour les hématies de Cobaye, mais cette action n'a lieu qu'en présence d'électrolytes. La propriété hémolysante ne se manifeste pas dans le torrent circulatoire, mais seulement *in vitro*.

Les hémolysines animales sont de deux types : directes ou indirectes. C'est là, d'ailleurs, une distinction toute provisoire.

Les premières, ou hémotoxines, ont été trouvées dans les proglotides de *Bothriocéphale* (Faust et Tallqvist, chez la larve de *Gastrophilus intestinalis* (Weinberg), dans le venin des Araignées, dans le sérum des Murénides (1) (Anguille, Murène, Torpille, etc.) (Camus et Gley).

Nous ne faisons que signaler les propriétés hémolytiques de ces venins, qui ne rappellent que de loin celles des sérums préparés.

Plus intéressantes, du point de vue auquel nous nous plaçons ici, sont les hémolysines du type *venins de Serpents*. Elles paraissent être, dans certaines conditions, du type direct. Mais il est probable que le mécanisme indirect est le plus répandu.

Le venin de *Cobra* a fait l'objet de recherches très nombreuses et du plus haut intérêt.

Les hématies de certains animaux (Chien, Cobaye, Porc, Souris, Oie, Lapin, Cheval) sont directement attaquées par l'hémolysine du Cobra. Celle-ci, au contraire, doit être « activée » pour hémolyser les hématies d'autres espèces (Bœuf, Mouton, Chèvre).

Le pouvoir activant du sérum sanguin n'est pas dû à l'alexine (Calmette), mais à une substance soluble dans l'alcool-éther (Korschum, Morgenroth). Cette substance est une lécithine qui, sous l'influence du venin, donne naissance à une *cobra-lécithide* (Kyes), dont l'action hémolytique est presque instantanée, même à 0°, sur les hématies de toutes les espèces animales.

C'est à Delezenne, S. Ledebt et Fourneau (1911) que revient le mérite (2) d'avoir élucidé le mécanisme de l'acti-

1. Le pouvoir hémolytique du sérum d'anguille est considérable (1 : 200.000 pour les hématies de Cobaye). Le chauffage à 58° le supprime définitivement, l'addition d'alexine étant impuissante à le rétablir.

2. Il convient cependant de citer les travaux de Wilstatter, Lüdecke, Von Dungern et Coca, Morgenroth qui avaient déjà montré le fractionnement de la molécule lécithinique, avec départ d'acide oléique.

vation du venin par la lécithine, en déterminant la nature exacte de la cobra-lécithide de Kyes. Ces auteurs ont, en effet, montré :

1^o qu'il existe dans le venin de Cobra une diastase douée d'une action spécifique sur les phosphatides ;

2^o que cette diastase libère l'acide oléique de la molécule des lécithines et que le corps nouveau ainsi formé, auquel Delezenne et Fourneau ont donné le nom de *lysocithine*, est chimiquement défini : c'est l'*anhydride de l'éther mono-palmitylglycéro-phosphorique de la choline*. Cette substance est soluble dans l'eau et l'alcool, insoluble dans l'éther et l'acétone. Elle est douée d'un pouvoir hémolytique considérable.

Cette transformation des lécithines, par départ d'acide oléique ou, plus généralement, de ses acides gras non saturés, paraît pouvoir être réalisée par un certain nombre de poisons ou venins différents, et se rencontrerait même, d'après Bel-fanti, dans l'intimité des tissus.

Si la cholestérine empêche l'hémolyse par le venin de Cobra, ce n'est pas en agissant sur le venin, mais en se combinant à la lysocithine, molécule à molécule (Delezenne et Fourneau).

Après ce très bref aperçu de l'hémolyse en général, l'hémolyse immunologique retiendra plus longuement notre attention, étant donné le rôle d'indicateur qu'elle joue dans la réaction de Bordet-Wassermann.

II. — Alexine et sensibilisatrice globulaires.

La curieuse propriété que possède l'alexine d'être fortement adsorbée par les antigènes sensibilisés est à la base de la réaction de Bordet-Gengou. Cette fixation de l'alexine est mise en évidence, comme l'on sait, à l'aide d'hématies sensibilisées, véritable test capable de déceler l'alexine libre, grâce à la production d'un phénomène d'observation facile : l'hémolyse.

Nous ne ferons que rappeler, ici, les travaux de Bordet et de l'Ecole belge, ceux d'Ehrlich et Morgenroth, sur l'hémo-

lyse par les sérums d'animaux spécialement préparés par injections répétées de suspension globulaire. Les faits démontrés par ces auteurs se schématisent ainsi :

1^o L'injection, à un animal appartenant à une certaine espèce zoologique, d'hématies provenant d'un animal d'une espèce différente, détermine l'apparition de propriétés hémolytiques spécifiques dans le sérum de l'animal injecté.

2^o L'hémolyse est due à l'action conjuguée de deux substances : l'une, thermostable, en ce sens qu'elle résiste, quoique atténuée, à un chauffage à 56^o ; l'autre, thermolabile, c'est-à-dire détruite par une exposition de quelques minutes à cette température.

3^o Cette dernière substance, appelée alexine ou complément, existe dans la plupart des sérums frais et ne possède aucune spécificité, tandis que la première, appelée ambocepteur ou sensibilisatrice, est caractéristique d'un antisérum déterminé et doit être considérée comme le vecteur de sa spécificité.

Lerôle que jouent l'alexine et la sensibilisatrice globulaires dans la réaction de Bordet-Wassermann nous oblige à étudier de très près les propriétés physico-chimiques de ces deux substances et les rapports qu'elles affectent entre elles dans le phénomène de l'hémolyse.

L'alexine. — Ce terme (de *αλεξω* : défendre, préserver, écarter un danger) est dû à Büchner et a été adopté par Bordet ; il correspond à celui de *complément* dû à Ehrlich et Morgenroth.

L'alexine a été mise en évidence dans le sérum sanguin d'animaux appartenant à la plupart des espèces zoologiques. Existe-t-elle dans le sang circulant ? Les avis à ce sujet sont partagés. Pour les uns, l'alexine n'existe pas *in vivo* : Wollman n'obtient pas le phénomène de Pfeiffer (qui ne se manifesterait qu'en présence d'alexine libre) dans une portion de jugulaire, isolée entre deux ligatures, chez l'animal vivant ; Metchnikoff pense que l'alexine n'apparaît qu'au moment de la coagulation ; Fuchs est du même avis, et

assimile la prothrombine au chaînon moyen de l'alexine. Mais, pour la plupart des auteurs, l'alexine existe dans le sang, avant toute coagulation : Hewlett, Ascoli, Falloise, Sweet, etc., la trouvent dans le plasma ; Morrison constate même qu'elle y est plus abondante que dans le sérum. Enfin, une hémolyse intra-vasculaire a pu être observée par Rehns et par Grüber à la suite d'une injection d'antisérum préparé avec les globules mêmes de l'animal injecté. Mais il convient d'être prudent sur l'interprétation de semblables expériences.

L'alexine se rencontre dans la lymphe, les exsudats, les transsudats (Strauss et Wolff, Hedinger, Lüdke), dans le lait (Pfaundler et Moro), mais cette dernière assertion est contredite par Kolf et Næggerath. Elle manque dans les larmes, la salive, le liquide céphalo-rachidien, l'humeur aqueuse (Sweet, Römer). On la voit apparaître dans le liquide céphalo-rachidien, au cours des méningites aiguës (Weil et Kafka).

C'est, de tous les sérums, celui du cobaye qui est le plus riche en alexine, les proportions étant, pour Capart, les suivantes : Cobaye 32. Homme 4, Lapin 4, Mouton 1.

De quelle nature est l'alexine ? Est-ce une substance individualisée ou une propriété physico-chimique des humeurs ? Cette question est vivement controversée. Lecomte du Noüy, qui a étudié, avec toute la rigueur scientifique désirable, les modifications physiques que subit le sérum à la température critique de 56° C., incline vers la seconde de ces hypothèses : « Comme bien des travailleurs le pensaient déjà, sans pouvoir confirmer leur impression par des faits expérimentaux, le pouvoir complémentaire est une propriété physico-chimique de la molécule de sérum non chauffé, que le chauffage — par suite de l'adsorption d'eau sur des groupes actifs ou simplement par suite de l'écartement subi par certains groupes chimiques — détruit plus ou moins. » Mais, c'est là une conception qui ne cadre pas parfaitement avec un certain nombre de faits expérimentaux. 1° D'abord, point n'est besoin d'atteindre la température critique pour noter la disparition

du pouvoir complémentaire d'un sérum. Ce pouvoir peut être très faible, ou même manquer, aussitôt après la saignée (plasma), ou, dans le sérum, aussitôt après la rétraction du caillot, et sans qu'une lente hydratation puisse être invoquée. Cette variation considérable du pouvoir alexique dans une même espèce animale, ou chez un même animal en expérience, s'oppose à la remarquable constance des propriétés physiques des protéines sériques. Hyde a observé une race de Cobayes dont le sérum était extrêmement pauvre en alexine, et A. Coca en a décrit une qui était caractérisée par l'absence complète d'alexine dans le sang (Station d'agriculture expérimentale de l'Etat de Vermont), et cette caractéristique paraissait être héréditaire. 2° Le sérum des embryons et des nouveau-nés est très pauvre en alexine. Chez le nouveau-né, on ne trouve pas d'alexine dans plus de la moitié des cas (Nattan-Larrier, Lépine, Mlle May). Le sérum des embryons de Poulet en est complètement dépourvu (Rywosch). 3° La saison, la qualité des aliments qu'ingère l'animal, ont une influence bien connue sur la richesse en alexine du sérum de Cobaye. 4° L'alexine est adsorbée par un nombre considérable de corps : la caséine, l'insuline, la peptone (Wendelstadt), le kaolin, le cholestérol (Landsteiner et Stankowic), l'acide silicique, l'hydrate de fer colloïdal, etc.

Si l'on admet, provisoirement, la thèse d'une substance alexique bien définie, on est loin de savoir quelle structure chimique lui attribuer.

Il semble que la molécule puisse être scindée en deux parties : l'une, entraînée avec les globulines, quand on précipite celles-ci par dialyse ; l'autre, demeurant dans le liquide surnageant. La première, a été appelée *chaînon moyen* ; la seconde *chaînon terminal* (Ferrata, Brand et de Hecker). Ritz, étudiant l'inactivation de l'alexine par le venin de Cobra, en arrive à la conception d'un troisième chaînon. Mais ces termes ne font que traduire une interprétation toute personnelle de quelques faits expérimentaux.

Plus intéressante est la conception qui fait de l'alexine un *complexe protéino-lipoïdique* (Rondoni, Belfanti, Brooks, etc.),

car cette théorie rejoint ce que nous savons déjà sur le rôle des savons, de la lécithine, de la lécithine transformée en lysocithine, etc. C'est dans ce domaine que les recherches paraissent devoir être le plus fécondes (1).

Mentionnons encore la théorie diastasique (Metchnikoff, Kiss, Scheller, Liefmann et Cohn). Si, à certains égards, l'alexine peut rappeler le mode d'action des diastases (thermolabilité, influence de la concentration sur l'activité, vieillissement), elle s'en éloigne par certains côtés (destruction au cours de la réaction, absence d'action protéolytique sur les stromas, etc.). Pour Neuberg, Rosenberg et Reicher, elle présenterait les propriétés d'une lipase.

Freund a fait une analyse minutieuse du sérum de Cobaye, ainsi que Carlos Vidal, Bertha Treich, etc. Aucun renseignement intéressant ne peut être tiré des résultats de ces recherches.

Comme l'on voit par cette trop rapide esquisse, s'il est des hypothèses qui méritent d'être retenues, nous n'en demeurons pas moins dans l'ignorance de la nature réelle de l'alexine.

Voici quelles sont les principales propriétés physico-chimiques du principe alexique :

a) Il est supprimé par un chauffage à la température de 56° durant trente minutes. Pour Noguchi et Bronfeubrenner, cette suppression ne serait que partielle (70 %) ; elle serait, en outre, dans une certaine mesure, réversible (Gramenitski). De nombreuses hypothèses ont été émises pour expliquer cette *inactivation*. Il est assez vraisemblable qu'il s'agit d'une hydratation moléculaire.

b) L'alexine est en effet très sensible à la dilution par l'eau distillée (Büchner et Ortenberger). Cette action suppressive

1. Liebermann et v. Fenivessy sont parvenus à réaliser un complexe *oléate de soude-protéine-sels de chaux* qui possède quelques propriétés de l'alexine : il est thermolabile ; il n'est pas hémolytique par lui-même, mais réactive un sérum hémolytique, chauffé. Mais d'après H. Schmidt, cette alexine artificielle hémolyserait également les hématies non sensibilisées.

est déjà manifeste à la température ordinaire ; elle est complète en cinq minutes à 37° (dilution au 1/10). On s'est demandé si cette hydrolabilité n'est pas en relation étroite avec l'état de stabilité des globulines (Sachs).

c) En règle générale, les acides et les alcalis (1) suppriment l'activité alexique d'un sérum. Il en est de même de l'éther, du chloroforme, de l'alcool (Fränkel, Gidemeister, etc.), des alcaloïdes, des narcotiques (Goldschmidt et Pribram, Traube Ferrai). Certains sels ont une action inhibitrice, tels le citrate de soude, le sulfate de baryum (Gengou).

d) La lumière solaire, les rayons ultra-violets (Ecker), les substances fluorescentes (Litchwitz) ont un pouvoir d'inactivation assez prononcé.

e) L'agitation inactive le sérum de Cobaye au 1/10 quand elle est prolongée pendant une heure : cela serait dû à l'oxygénation (Courmont et Dufourt, Jacoby) ou à la naissance d'un précipité qui adsorberait l'alexine (Schmidt et Liebers). Un sérum, ainsi traité, pourrait être réactivé par un sérum lui-même inactivé par la chaleur (Azzi).

La filtration sur bougie L³ fait disparaître l'activité alexique d'un sérum frais (Arloing, Langeron et Sempé), mais on peut obtenir le passage de l'alexine au travers de la bougie en augmentant la concentration en sel de la solution (Massol et Novaczinski).

D'une façon générale, l'alexine est adsorbée par toutes les substances à l'état pulvérulent, par les gels, divers lipoides et graisses, par les floculats et surtout les floculats naissants.

f) L'optimum de la réaction du milieu, correspondant à une activité maximum de l'alexine, se situe autour du pH sanguin (Michaelis et Skwirsky).

g) Le pouvoir alexique d'un sérum baisse avec le temps : dans une expérience de Massol et Grysez, portant sur

1. Le bicarbonate de soude, employé par Desmoulières, possède, à faible dose, la propriété de favoriser l'hémolyse en présence d'un antigène très anticomplémentaire. Mais un excès de bicarbonate de soude supprime l'activité alexique (Andresco, 1930).

10 sérums de Cobaye conservés à la glacière, il avait diminué progressivement et n'était plus, au 9^e jour, que de 50 % pour l'un, de 12,5 à 37,5 % pour les autres ; au 16^e jour, 80 à 90 % de l'activité alexique avait disparu.

Nous reviendrons plus loin sur la conservation de l'alexine en présence de solutions concentrées de chlorure de sodium.

La chute alexique du sérum de Cobaye est rapide et irrégulière au début. D'après Dold et Klinghart, l'activité baisse pendant les quatre premières heures qui suivent la transsudation du sérum, remonte pendant deux heures pour atteindre, par conséquent, un maximum à la 6^e heure. Elle baisse ensuite très lentement et régulièrement. L'optimum d'emploi est situé entre douze et vingt-quatre heures.

La sensibilisatrice. — Le sérum de certaines espèces animales possède une sensibilisatrice naturelle dirigée contre les hématies d'une ou plusieurs autres espèces. On sait que le sérum humain manifeste une activité hémolytique spontanée anti-Mouton. Nous avons vu, d'autre part, que l'injection à l'animal de l'antigène hétérogénétique de Forssmann provoque l'apparition, dans le sang, d'une sensibilisatrice anti-Mouton. Mais, le phénomène le plus général est la production d'une sensibilisatrice artificielle, remarquablement spécifique de l'espèce d'hématies ayant servi d'antigène, et cela s'obtient même chez les Vertébrés inférieurs poïkilothermes (Noguchi, Lazar), avec des hématies anucléées ou nucléées, ou même en utilisant le sang des Invertébrés (Szczawinska).

Pour la préparation des animaux, toutes les voies d'introduction parentérales ne sont pas également bonnes : la voie intraveineuse est la meilleure : viennent ensuite la voie intrapéritonéale et la voie sous-cutanée ou même intradermique.

Les hématies doivent être soigneusement débarrassées de toute trace de sérum, par lavages répétés, sous peine d'obtenir un sérum hémolytique doué également de propriétés agglutinantes. Nous reviendrons, plus loin, sur la prépara-

tion pratique d'un sérum hémolytique Lapin anti-Mouton.

La production artificielle d'une hémolysine peut subir une stimulation biologique (abcès de fixation, inoculation de bacilles tuberculeux, etc.).

Le liquide céphalo-rachidien d'animaux dont le sang est riche en anticorps (agglutinines, hémolysines, précipitines) n'en renferme pas, et les essais tentés pour forcer la barrière hémato-encéphalique ont tous échoué (Ciuca, Balteanu).

La question que nous nous sommes déjà posée, à propos de l'alexine, se pose à nouveau ici : la sensibilisatrice est-elle une substance individualisée chimiquement, ou simplement une propriété physico-chimique des albumines sériques ?

Cette dernière opinion est soutenue par quelques auteurs, mais elle a contre elle, ici encore, certains faits expérimentaux : 1^o le placenta est perméable aux hémolysines artificielles, or, l'on sait qu'il est imperméable aux protéines maternelles (Nattan-Larrier, Ramon, P. Lépine et Grasset) ; 2^o les hématies adsorbent très fortement la sensibilisatrice spécifique de leur espèce, et la retiennent si solidement, dans l'intimité de leur stroma, que plusieurs lavages au sérum physiologique n'en enlèvent qu'une infime proportion ; 3^o P. Girard et M. Lourau (1934) sont parvenus, à la suite de leurs recherches sur l'électrophorèse des sérums hémolytiques, aux conclusions suivantes : l'hémolysine est une substance naturelle ; ce n'est pas une protéine, du point de vue électrique ; c'est un ion dont le point iso électrique est aux environs de 6,2.

Les diverses recherches chimiques entreprises pour isoler la sensibilisatrice des sérums hémolytiques (Piettre et Chrétien, Bang et Forssmann) sont sujettes à caution, étant donné la brutalité des procédés employés et les précipitations successives qui peuvent fort bien entraîner des substances éminemment adsorbables. D'autre part, on caractérise parfois une hémolysine dans une fraction quelconque, ou après adsorption par des hématies, en évaluant la disparition de l'alexine et sans tenir compte du fait que celle-ci se fixe sur

des stromas altérés en l'absence d'hémolysine, qu'elle est très sensible à des actions chimiques même faibles et ne révèle un anticorps que dans des conditions étroitement déterminées. Aussi, la plus grande obscurité règne-t-elle encore sur la nature chimique de la sensibilisatrice, comme, d'ailleurs, sur celle des anticorps en général. Peut-être le caractère lipoidique de ces substances est-il le plus vraisemblable (Jvar Bang, Locke et Hirsch, etc.), plus vraisemblable que l'attribution de toute activité immunitaire — anticorps et complément — à la fraction globulines des protéines sériques. Nous avons déjà insisté sur ce point : à la notion simpliste de l'interaction colloïdale doit être substituée la notion de spécificité chimique.

Les propriétés physico-chimiques des sensibilisatrices hémolytiques ont été peu étudiées. On connaît leur relative thermostabilité : leur température critique se situant entre 65° et 72°. Il y a cependant des exceptions : la sensibilisatrice du sérum de grenouille est détruite à 56°.

Quoi qu'il en soit de la nature chimique et du mode de formation des sensibilisatrices globulaires, un fait demeure : leur rigoureuse spécificité pour une espèce donnée d'hématies. Il se produit une véritable *adsorption sélective* quand sensibilisatrice et hématies se trouvent dans un milieu commun : l'hématie se sensibilise et devient alors « vulnérable » à l'action de l'alexine, action qui se manifeste nettement par l'hémolyse.

L'hématie sensibilisée et l'alexine forment, pour employer l'expression des sérologistes, un *complexe hémolytique*. Après avoir étudié séparément chacun de ses constituants, nous allons maintenant envisager les rapports qu'ils doivent présenter à l'intérieur du complexe pour qu'il y ait hémolyse, ou, en d'autres termes, quelles sont les lois de l'hémolyse en fonction de l'alexine, de la sensibilisatrice et des globules rouges.

III. — Lois physico-chimiques de l'hémolyse alexique.

Les relations quantitatives qui existent entre les trois facteurs du complexe hémolytique ont fait l'objet de très nombreuses recherches. Bordet, Morgenroth et Sachs, Arrhénius et Madsen, Neisser et Wechsberg, P. Gay, pour ne citer que quelques-uns, ont été successivement attirés par le problème du rapport sensibilisatrice-alexine. Mais, c'est surtout Noguchi (1909-1910 et 1914) qui, en insistant sur la notion de suppléance, a fait prévoir l'existence de lois précises.

Malheureusement, la plupart de ces auteurs, si l'on en excepte Arrhénius, P. Gay et quelques rares autres, sérologistes de profession, ont abordé ces problèmes dans une ignorance complète des principes les plus élémentaires de la chimie physique, ce qui a eu pour effet de tout embrouiller en accumulant les affirmations contradictoires.

Quand on compulse leurs mémoires, articles, notes et communications aux Académies et aux Sociétés, on constate que les notions de concentration, de seuil, de vitesse, etc., leur sont parfaitement étrangères et qu'ils raisonnent sur l'hémolyse en naturalistes, à l'aide d'un vocabulaire pseudo-scientifique où les mots d'*unités* et de *doses* ont une place privilégiée.

Il faut en arriver à Lasseur et Spillmann (1921) pour voir paraître une étude physico-chimique correcte du complexe hémolytique.

C'est, en partie, d'après ces auteurs que nous énoncerons les principes généraux et les lois mathématiques de l'hémolyse alexique, tels qu'ils découlent des nombreuses expériences auxquelles se sont livrés Lasseur, Spillmann et leurs collaborateurs, principes et lois que, pour la plupart, nous avons nous-même vérifiés (1).

1. Nous ne reviendrons pas ici sur les considérations qui ont été développées au chapitre précédent à propos de l'adsorption, des notions de concentration, de quantité absolue, etc.

1° *L'électrolyte intervient dans le phénomène non seulement en réalisant l'isotonie du système, mais également par la nature de ses ions.*

Toute expérience sur l'hémolyse doit se faire en milieu isotonique. Mais il n'est pas indifférent de réaliser cette isotonie à l'aide de telle ou telle substance : en milieu glucosé, toute hémolyse alexique est impossible. Les ions Mg, Ca, Ba, I, posséderaient, d'après Friedberger, Hektoen, Ruediger, une action nettement empêchante.

2° *La diffusion de l'hémoglobine, en milieu isotonique, dépend des concentrations respectives de la sensibilisatrice et de l'alexine dans le cortex de l'hématie.*

Sans avoir reçu de démonstration, à proprement parler, cette proposition est très vraisemblable, étant donné : 1° la faible vitesse du phénomène ; 2° son irréversibilité.

3° *Les concentrations en sensibilisatrice et en alexine dans le cortex de l'hématie dépendent, à la fois, de leur concentration et de leur quantité absolue péricglobulaires. Corollaire : L'hémolyse d'une quantité donnée d'hématies sensibilisées est fonction, à la fois, de la concentration et de la quantité absolue de l'alexine péricglobulaire.*

Cela ressort de ce que nous savons sur l'adsorption. L'hémolyse est sous la dépendance de la concentration en alexine, mais cette concentration, tendant à s'abaisser au fur et à mesure de l'adsorption, est elle-même sous la dépendance du rapport entre la masse de l'adsorbant et celle de l'adsorbé, c'est-à-dire du rapport entre la quantité de globules (1) et la quantité absolue d'alexine.

L'expérience suivante confirme cette notion élémentaire. Un volume *g* de suspension de globules sensibilisés est hé-

1. Certains auteurs parlent de la « concentration en hématies ». Il y a là un abus de langage, car les hématies sont un corps solide non en solution. Les hématies n'agissent pas, en tant qu'adsorbant, par leur « concentration » mais, en plus de leur nombre, par un coefficient qui dépend de la masse, de la surface, de la nature, etc., d'une hématie-type.

molysé par un volume a de sérum de Cobaye dilué au taux-limite (donnant l'hémolyse complète en trente minutes). Des multiples croissants de a sont distribués dans une série de tubes (par exemple : 1, 2, 3, 4, 5, 6 cmc.) et l'on ajoute, dans chaque tube, un même volume g de suspension globulaire.

Dans ces conditions, l'hémolyse débute par le tube 6, où elle est précoce, et apparaît ensuite successivement en 5, 4, 3, 2 et 1. Or, dans chacun de ces tubes, chaque hématie était initialement entourée d'une solution alexique de même concentration. Mais la concentration a baissé plus vite dans le tube 1 que dans le tube 6, par suite de l'adsorption de l'alexine.

Cela explique d'apparentes contradictions dans les résultats de certaines expériences, les unes paraissant prouver que l'alexine agit selon sa quantité absolue (Leschly, Kaup et Krestner); les autres, qu'elle n'agit que suivant sa concentration (Kiss, Scheller et la plupart des sérologistes).

4° La fixation de la sensibilisatrice et de l'alexine sur le corps globulaire présente un seuil de concentration, au-dessous duquel aucune adsorption n'a lieu, quelle que soit la durée du contact ; l'existence d'une concentration-limite a pour conséquence de rendre toujours incomplète la fixation de l'alexine.

L'existence des concentrations-limites est un phénomène d'ordre général. Arrhénius (1904) avait signalé un seuil de concentration, en lécithine, au-dessous duquel ne se produit plus l'hémolyse par la cobralysine. Les exemples de ce genre sont nombreux.

Le seuil alexique absolu est très difficile à déterminer. Il s'agit, le plus souvent, d'un seuil relatif, en fonction de la quantité de globules à hémolyser, du degré de sensibilisation de ceux-ci, et, parfois même, de la durée de la réaction.

5° La fixation de la sensibilisatrice et de l'alexine n'est pas un phénomène réversible.

Faut-il faire intervenir, pour expliquer cette irréversibilité, la notion d'affinité chimique, à laquelle nous avons eu déjà

recours, ou s'agit-il d'une combinaison chimique vraie succédant à l'adsorption? Quoi qu'il en soit, la réversibilité, qui caractérise l'adsorption pure, ne se rencontre pas ici, et en particulier, dans la fixation de la sensibilisatrice. Nous verrons ailleurs les conclusions pratiques que l'on en peut tirer (1).

6° *Les variations de la concentration en sensibilisatrice et en alexine — au-dessus de leurs seuils respectifs — retentissent sur la vitesse du phénomène, c'est-à-dire sur la durée de la période qui s'écoule entre le début de la réaction et l'apparition de l'hémolyse.*

Cette notion est fort importante dans la pratique sérologique, ainsi que nous le verrons plus loin. La diminution de la concentration en alexine — à la suite, notamment, d'une fixation antigénique partielle — peut se traduire simplement par un allongement de la période de latence, c'est-à-dire par un retard à l'hémolyse. C'est ainsi que Vernes (1920) a pu écrire : « La réaction de Bordet-Gengou, dite de la « déviation du complément », consiste à déterminer la nature d'une infection par le retard que le sérum sanguin est susceptible d'apporter à l'hématolyse, en présence de l'agent de cette infection. » Cette opinion n'est pas soutenable, car elle ne tient pas compte de la notion de seuil, et la définition qui précède est celle d'une réaction mal réglée, avec excès initial d'alexine.

7° *La quantité absolue d'alexine, la quantité absolue de globules sensibilisés et le volume total de la réaction sont unis par la relation suivante :*

$$\frac{A^n}{V^{n-1} \times G} = K$$

A = alexine exprimée en sérum de Cobaye,

G = suspension d'hématies d'un titre arbitraire,

V = volume total,

n = coefficient variable dépendant de la sensibilisation,

K = constante.

1. L'existence d'un seuil, l'irréversibilité de la fixation de la sensibilisatrice sur les globules rouges, le coefficient d'adsorption élevé de ceux-ci, rendent compte du phénomène de Bordet-Danysz.

8° Pour un même volume total et un même nombre d'hématies, l'hémolyse minimum peut être obtenue à l'aide de proportions variables de sensibilisatrice et d'alexine ; il y a, entre certaines limites, suppléance réciproque de ces deux facteurs qui sont unis l'un à l'autre par la relation suivante (Lasseur et Spillmann) :

$$(C_1 - a) (C_2 - b) = K.$$

où C_1 désigne la concentration de la sensibilisatrice, C_2 celle de l'alexine, a la concentration-limite de la sensibilisatrice, b celle de l'alexine, K une constante.

La courbe représentative de cette équation, construite expérimentalement par points, est une branche d'hyperbole très régulière et sans discontinuité, a et b étant des coordonnées asymptotiques.

L'équation précédente est très générale. Elle est de beaucoup préférable à celle d'Arrhénius et Madsen :

$$(Aa - H) (Bs - H) = cH.$$

dans laquelle a désigne l'alexine, s la sensibilisatrice, H l'hémolysine et où A , B et c sont des constantes. L'« hémolysine » de l'École de Copenhague est une substance parfaitement hypothétique, et point n'est besoin d'y avoir recours pour rendre compte du phénomène. Il suffit de faire intervenir la notion de *concentration-limite* qui a, répétons-le, un caractère de généralité physico-chimique.

TROISIÈME PARTIE

La standardisation des réactions d'hémolyse.

CHAPITRE PREMIER

La réaction-type.

I. — Principes généraux.

L'analyse que l'on a faite, dans la seconde partie de cet exposé, du mécanisme de la réaction de Bordet-Wassermann, en a montré l'étroit déterminisme physico-chimique. Ressort-il de cette étude quelques règles pratiques, applicables à la construction rationnelle d'une réaction-type (1) ?

Examinons d'abord en quels termes se pose le problème de la séro-réaction du point de vue technique. Il peut être systématisé de la façon suivante :

- 1° Formation rigoureusement spécifique d'un « complexe fixateur ».
- 2° Adsorption, par ce complexe, de la plus grande fraction possible de l'alexine ambiante.
- 3° Détection du phénomène précédent à l'aide d'un test hémolytique.

1. Il ne s'agit, au cours de cette étude, que de réactions au sérum chauffé.

Il y a une étroite interdépendance entre ces différents temps de la réaction. Avant d'examiner comment ils s'articulent entre eux, il nous paraît indispensable de préciser soigneusement les principes directeurs qui se dégagent, à présent, des données théoriques que nous avons acquises.

PREMIER PRINCIPE. — *Les réactifs interviennent dans la réaction selon leur concentration en fonction du volume total.*

C'est là une notion qui pourra paraître très élémentaire. Il n'est cependant pas inutile de la rappeler ici, car l'habitude s'est établie, en sérologie, de ne considérer que la dilution d'emploi et non celle de réaction.

Cela est sans inconvénient quand il s'agit simplement de désigner un réactif, mais quand on parle de son activité et de la façon dont il intervient dans la réaction, il n'en est plus de même. Lorsque, par exemple, on nous dit, sans plus, que « Weimberg s'est servi de 0 cmc. 3 de sérum, l'école de Calmette parfois de 0 cmc. 5 », ce langage n'a, proprement, aucune signification.

Autre exemple. La comparaison entre les dilutions antigéniques employées dans deux méthodes différentes ne saurait se faire d'après la dilution d'emploi des antigènes, mais bien d'après leur dilution de réaction. Ainsi, Demanche se sert d'un antigène dilué au 1/200, cinq fois plus dilué, par conséquent, qu'un antigène au 1/40 introduit dans la réaction de Calmette et Massol classique. Or, la dilution réelle de ces deux antigènes — leur *dilution de réaction* — est à peu près la même : 0,23 % et 0,25 % respectivement, par rapport au volume total du premier temps de la réaction.

SECOND PRINCIPE. — *Les autres facteurs étant déterminés et constants, la vitesse de fixation du complément dépend du degré de réactivité du sérum ; la vitesse de l'hémolyse, au second temps de la réaction, dépend de la concentration alexique.*

Ce sont les conséquences pratiques de la notion de vitesse, notion sur laquelle nous nous sommes expliqués ailleurs.

a) La durée du premier temps de la réaction doit être

d'autant plus prolongée que la réactivité du sérum est plus faible et que l'antigène est plus dilué. Certains auteurs estiment que la fixation est très rapide. C'est ainsi que Bénard et Joltrain exécutent simultanément les deux phases de la réaction, la seconde étant plus lente à s'effectuer que la première. L'erreur de ces auteurs est évidemment de ne faire aucune différence entre les faibles et les fortes réactivités, et de penser que la réaction garde la même vitesse dans tous les cas.

b) Une fixation partielle de l'alexine, au premier temps, peut ne se manifester que par une diminution de la vitesse de l'hémolyse, lorsque la concentration alexique, est un peu élevée par rapport au seuil. Ce *retard à l'hémolyse*, auquel on attribue parfois une valeur diagnostique, n'est pas un critère commode, et encore moins, précis, de la fixation partielle du complément. De plus, l'allongement de la période de latence peut être dû à des causes autres que la diminution de la concentration alexique, à des différences de température entre les tubes, en particulier.

On évite de placer la réaction dans de telles conditions par un dosage précis de l'alexine, de façon que la moindre diminution de celle-ci fasse passer la concentration au-dessous du seuil : la fixation ne se traduit plus, dès lors, par un retard, mais par une absence complète d'hémolyse (1).

TROISIÈME PRINCIPE. — *L'alexine doit intervenir dans la réaction sous une concentration et un volume absolu aussi faibles que possible.*

Nous savons que, lorsque l'adsorption est en jeu, plus une solution est diluée, plus elle perd, par ce mécanisme, de substance dissoute (proportionnellement à la quantité totale de corps dissous). Nous avons déjà donné un exemple de ce phénomène, au cours de notre étude sur l'adsorption. En

1. L'hémolyse partielle est due à l'existence de plusieurs seuils, correspondant à des lots d'hématies à caractéristiques légèrement différentes de l'un à l'autre. Cette inégalité dans la diffusibilité de l'hémoglobine est vraisemblablement en rapport avec l'âge des hématies.

voici un autre, très démonstratif, emprunté à Lasseur et Spillmann.

La fixation — par un nombre constant d'hématics — de la sensibilisatrice que renferment des solutions de concentration croissante est de moins en moins complète au fur et à mesure de l'augmentation du taux des solutions, ainsi qu'en témoignent les chiffres suivants :

Sensibilisatrice totale	Sensibilisatrice fixée	Sensibilisatrice fixée (en % de la quantité totale au début de chaque opération)
0,020	0,020	100,0 %
0,030	0,027	90,0 —
0,040	0,035	87,0 —
0,060	0,050	83,0 —
0,080	0,065	81,2 —
0,160	0,115	71,8 —
0,310	0,175	56,4 —

Nous avons obtenu avec l'alexine, dans des expériences similaires, des chiffres comparables aux précédents. Il s'agit là d'un phénomène absolument général, caractéristique essentielle de l'adsorption. Aussi son importance pratique est-elle très grande. Si nous considérons, en effet, le second temps de la réaction de Wassermann, le facteur essentiel qui intervient dans l'hémolyse est *l'appauvrissement* en alexine — exprimé en % de la quantité primitivement en solution — et non la quantité absolue d'alexine fixée au cours du premier temps.

Par conséquent, plus la solution d'alexine sera diluée, plus cet appauvrissement en alexine sera considérable (dans l'hypothèse, cela s'entend, d'un sérum syphilitique et de l'existence d'un complexe fixateur). Et plus l'appauvrissement en alexine sera marqué, plus la concentration alexique aura tendance à passer au-dessous du seuil hémolytique, ce qui est le but poursuivi.

Les considérations précédentes permettent d'expliquer simplement le fait sérologique bien connu de la négativation des sérums faiblement positifs dans les systèmes de concentra-

tion croissante en alexine, quelle que soit la rigueur du dosage initial.

L'expérience suivante, due à Demanche, est fort suggestive à cet égard.

On règle trois mélanges différents d'alexine et de sensibilisatrice, ayant même activité hémolytique (loi de suppléance) dans lesquels les quantités de complément sont entre elles comme 1, 2 et 4. On détermine, par ce dosage, trois types de réactions à seuil alexique progressivement croissant. Ces quantités différentes d'alexine sont alors engagées dans une réaction de fixation, en présence de sérums fortement ou partiellement positifs. Bien que les complexes hémolytiques soient équivalents et qu'il n'y ait pas un excès d'alexine, les résultats fournis par ces trois réactions sont, pour un même sérum syphilitique, nettement différents les uns des autres. « S'agit-il de sérums fortement positifs ? La netteté de la réaction, sa prolongation, la brusquerie de sa chute avec les doses faibles de complément contrastent avec son atténuation et son obscurcissement en présence des doses fortes. Pour les sérums faiblement positifs, on voit clairement l'intensité de la réaction diminuer avec l'augmentation du complément. Et c'est bien une action neutralisante que celui-ci exerce, puisque l'activité globale du complexe hémolytique reste constante. »

Il n'est pas besoin d'avoir recours, pour expliquer ce phénomène, à une action « neutralisante » des albumines du sérum de Cobaye sur le système séro-globulinique du sérum humain, théorie classique que l'on doit à Ronchèse. Les lois de l'adsorption l'auraient fait prévoir ; elles en fournissent une explication entièrement satisfaisante.

Le complexe fixateur a, en effet, adsorbé un *pourcentage* d'alexine de moins en moins grand, à mesure que s'élevait, dans ces réactions différentes, la concentration de cette dernière.

La masse du complexe fixateur intervient également dans cet appauvrissement du milieu en alexine. Mais, comme il existe une zone de dilution optima du sérum suspect, et

que l'on a avantage à se placer au pôle de forte dilution de cette zone, pour des raisons que nous examinerons plus loin, il ne reste qu'une solution : fixer aussi bas que possible la concentration alexique. Toutefois, on ne peut descendre au-dessous d'une certaine concentration, car le test hémolytique doit être, de son côté, appauvri en globules selon un rythme beaucoup plus rapide, et l'on est vite arrêté par la difficulté de la lecture, par une diminution de la vitesse de l'hémolyse qui entraîne une imprécision fâcheuse dans la détermination du seuil alexique, et surtout par l'augmentation de l'erreur relative.

Il existe donc, étant donné un certain volume total V au second temps de la réaction, *une densité globulaire optima*, qui résulte d'un compromis entre les deux adsorptions possibles de l'alexine : au premier temps, l'adsorption par le complexe fixateur ; au second temps, l'adsorption par les globules sensibilisés.

Aussi voit-on Wyler d'une part, Sordelli et Miravent de l'autre, étalonner très exactement leur suspension globulaire, à l'aide d'un hémoglobininètre de précision. Car le sang défibriné de Mouton en provenance des abattoirs présente une densité globulaire des plus variables, d'une fois à l'autre, et les dilutions qu'on en fait doivent être soigneusement ajustées à un titre fixe par dosage.

Voici les concentrations alexiques (en fonction du volume total du premier temps) réalisées dans les principales techniques actuellement en usage :

Calmette-Massol Standard.....	8 %
Sordelli-Miravent.....	9 —
Calmette-Massol classique.....	15 —
Desmoulière.....	16 —
Harrison-Wyler.....	16 —
Jacobsthal	17 —
Wassermann (var. Demanche).....	21 —
Demanche.....	23 —
Wassermann classique.....	26 —
Debains.....	31 —

Mais il faut remarquer que la concentration alexique *utile* n'est pas, dans tous les cas, celle qu'assigne le tableau précédent. Certains antigènes, nettement anticomplémentaires, abaissent la concentration de l'alexine : c'est le cas de la méthode de Harrison-Wyler. Ou encore, l'addition de cholestérol à l'antigène produit le même effet, en déviant une partie de l'alexine. Il en est ainsi du procédé de Demanche, très sensible avec un extrait cholestérolé, moins sensible que le procédé de Sordelli-Miravent, avec un extrait simple, ainsi que nous l'avons, après A. Ravelo, personnellement constaté. Par contre, la technique de Sordelli qui fonctionne avec l'antigène de Bordet-Ruelens, sans aucune addition de cholestérol, est une des plus sensibles, avec 9 % seulement de concentration alexique. Debains, malgré une concentration 3,5 fois plus forte atteint une sensibilité égale à la précédente, grâce à l'intensité de l'adsorption, plus marquée aux basses températures, et à l'emploi d'un antigène cholestérolé.

La quantité absolue d'alexine intervient également, comme nous l'avons montré au Chapitre II de la seconde Partie de ce travail, et conformément aux lois de l'adsorption.

QUATRIÈME PRINCIPE. — *La solution antigénique doit être très diluée, conformément au principe fondamental de l'adsorption. Cependant, il existe une certaine proportionnalité entre la concentration de l'antigène et le degré de réactivité du sérum syphilitique.*

L'adsorption de l'antigène sur la molécule globulinique sera d'autant plus marquée que la concentration de celui-ci sera plus faible. Il s'ensuit que la différence entre la concentration interfaciale de l'antigène et sa concentration ambiante sera d'autant plus grande que l'antigène sera plus dilué. Cependant, pour de fortes réactivités, soit que la surface de l'adsorbant soit plus grande, soit qu'une partie de l'antigène adsorbé soit dissimulée à cause de la force attractive de l'anticorps, la concentration interfaciale de l'antigène n'atteint pas le seuil d'affinité alexique ou présente une affinité diminuée.

Il en résulte que le collage de l'alexine ne se fait pas ou se fait mal.

Il existe donc une concentration antigénique au-dessous de laquelle il ne faut pas descendre, tout au moins en ce qui concerne les sérums fortement positifs. Mais on a intérêt à se rapprocher autant que possible de cette concentration.

Cette limite inférieure de dilution antigénique est facile à rechercher en présence de sérums syphilitiques de réactivité variée. Elle se situe autour de 0,15 % (en fonction du volume total du 1^{er} temps).

CINQUIÈME PRINCIPE. — Il existe, pour la bonne formation du complexe fixateur, une dilution optima du sérum suspect, les autres facteurs de la réaction étant convenablement réglés.

Disons de suite que n'interviennent, ici, ni le pouvoir hémolytique naturel du sérum, ni son éventuel pouvoir anti-complémentaire.

Lorsque l'on compare les procédés au sérum chauffé et ceux qui emploient le sérum frais, on constate entre ces deux groupes une différence du simple au double, et même davantage, dans les concentrations en sérum suspect.

Sérum chauffé.....	{	Wassermann.....	10	%
		Sordelli.....	10	—
		Jacobsthal.....	10	—
		Desmoulière.....	10	—
		Bordet-Ruelens.....	8	—
		Demanche.....	7	—
		Wyler.....	6,6	—
		Debains.....	6	—
		etc.		
Sérum non chauffé	{	Hecht-Mutermilch.....	25	%
		Rubinstein.....	25	—
		Bauer-Hallion.....	25	—
		etc.		

Or, nous savons que le chauffage du sérum, à 56°, provoque, par hydratation, une augmentation de volume des

molécules sériques. Pour que la densité moléculaire soit la même avant et après le chauffage, il faut diluer davantage le sérum chauffé que le non chauffé (1).

La détermination de la zone optima de densité moléculaire est aisée. Il suffit de pratiquer des réactions dans lesquelles des sérums positifs sont engagés sous des volumes de plus en plus faibles. On obtient ainsi, graphiquement, un palier et, à partir d'une certaine dilution, une chute rapide de la positivité. La dilution déterminée de la sorte marque la limite inférieure de *totale réactivité* du sérum syphilitique. On vérifie cette limite à l'aide de sérums faiblement positifs, et l'on fixe la dilution optima à une valeur moins forte, afin de garder une marge suffisante de sécurité. On s'en rapproche, néanmoins, pour trois raisons : 1^o pour diminuer, autant que possible, l'influence de l'hémolysine naturelle anti-Mouton ; 2^o pour annihiler le pouvoir anti-complémentaire ou agglutinant de certains sérums ; 3^o parce que l'emploi d'une très petite quantité de sérum est précieux dans la pratique des réactions multiples.

Nous avons vu que la concentration (en fonction du volume total du premier temps) se situe, selon les diverses techniques au sérum chauffé, entre 10 % et 6 %. En quantité absolue, Demanche emploie 0 cmc. 05, et Debains 0 cmc. 025 seulement de sérum par tube.

SIXIÈME PRINCIPE. — *L'alcool, incorporé avec l'extrait antigénique dans la réaction, diminue la sensibilité de celle-ci en augmentant l'affinité du milieu ambiant pour l'antigène, et en diminuant, de ce fait, son coefficient d'adsorption. Le chlorure de sodium, à cause de son pouvoir relarguant, est un antagoniste de l'alcool. Le rapport $\frac{\text{alcool}}{\text{NaCl}}$ est un des facteurs de sensibilité de la réaction.*

On sait que l'antigène de Bordet-Ruelens est plus sensible

1. La molécule protéinique joue dans les réactions anticorps un rôle non encore précisé, mais très probablement en rapport avec sa fonction *vecteur d'anticorps*.

après évaporation de l'alcool. Lorsque l'on se sert d'extrait dilué directement, il faut déterminer la concentration optimale de l'électrolyte. Bien entendu la solution de NaCl devra être toujours préparée avec la plus grande rigueur quant au titre, et l'antigène employé toujours à la même concentration.

Ainsi le rapport $\frac{\text{alcool}}{\text{NaCl}}$, déterminé une fois pour toutes, ne variera pas à chaque séance, entraînant des variations de sensibilité de la réaction.

Pour nous résumer, les principes directeurs, dont toute élaboration d'une réaction au sérum chauffé devrait s'inspirer, sont dans l'ordre logique les suivants :

- 1° Choisir un *volume total* pratique et une *densité globulaire* faible, mais compatible avec certaines exigences de lecture et d'erreur relative ;
- 2° A cette suspension globulaire ainsi fixée correspond une *dilution alexique* minima ;
- 3° Régler le *volume de sérum suspect* assez près du minimum, sans cependant atteindre celui-ci ;
- 4° Employer une *dilution antigénique* voisine de la dilution maxima donnant encore des réactions nettes avec les sérums faiblement ou fortement positifs.

On détermine ainsi les proportions les meilleures dans lesquelles doivent se trouver, au cours du premier temps de la réaction, le sérum suspect, l'antigène et l'alexine. Reste, à présent, le difficile problème du réglage du test hémolytique, lequel doit, au cours du second temps, mettre en évidence le degré d'adsorption de l'alexine par le complexe fixateur.

II. — Réglage du test hémolytique.

Le test hémolytique doit être réglé de telle sorte que la moindre diminution de concentration alexique se traduise par une absence totale ou partielle d'hémolyse. En d'autres termes, étant donné un certain volume globulaire, il faut

déterminer les caractéristiques d'un complexe alexine-sensibilisatrice fonctionnant exactement au seuil hémolytique.

Les facteurs en présence sont donc :

- 1° la concentration alexique ;
- 2° la concentration de la sensibilisatrice ;
- 3° le nombre d'hématies engagé dans la réaction.

Nous avons étudié, plus haut, les relations précises qui unissent ces facteurs dans le phénomène de l'hémolyse (1). Rappelons que la concentration alexique et la concentration de la sensibilisatrice sont unies par l'équation suivante :

$$(C_1 - a) (C_2 - b) = K$$

où C_1 désigne la concentration de la sensibilisatrice, C_2 celle de l'alexine a , la concentration-limite de la sensibilisatrice, b la concentration-limite de l'alexine, K une constante.

On sait que cette équation est représentative d'une hyperbole, a et b étant ses coordonnées asymptotiques. Lorsque $(C_1 - a)$ croît indéfiniment, C_2 tend vers b ; et réciproquement, lorsque $(C_2 - b)$ croît indéfiniment, C_1 tend vers a .

C'est dire que l'alexine se trouve à sa concentration-limite, donc à sa *concentration minimum active*, pour un excès de sensibilisatrice. Inversement, la sensibilisatrice atteint sa concentration-limite en présence d'un excès d'alexine.

Entre ces deux seuils a et b , l'hémolyse d'une quantité déterminée d'hématies est complète pour des valeurs bien définies de la concentration alexique et de la concentration en sensibilisatrice, sans excès ni de l'une, ni de l'autre.

Par conséquent, étant donné un certain nombre d'hématies G et un volume total V , les deux autres facteurs du test hémolytique peuvent être déterminés de deux façons différentes.

a) On choisit arbitrairement une valeur C'_1 de concentration en sensibilisatrice.

La concentration en alexine est assujettie à une valeur C'_2

1. Voir *Lois physico-chimiques de l'hémolyse alexique*, 2^e partie, chap. II.

bien déterminée pour les valeurs de C'_1 suffisamment éloignées de a .

$$C'_2 = \frac{K}{C_1 - a} + b$$

Pour des valeurs de plus en plus éloignées de a , C'_1 correspond à une concentration alexique extrêmement voisine de b , c'est-à-dire du seuil alexique relatif.

Les valeurs de C'_2 se déterminent expérimentalement par tâtonnements, en recherchant la limite inférieure hémolytique.

Cette première façon de procéder correspond au *dosage direct du complément*.

b) On choisit arbitrairement une valeur C'_2 de concentration en alexine.

De même que précédemment, le C'_2 choisi correspond, avec les mêmes réserves, à une valeur définie de C'_1 :

$$C'_1 = \frac{K}{C_2 - b} + a$$

Pour des valeurs de C_2 très éloignées de b , C'_1 représente pratiquement le seuil d'action de la sensibilisatrice a .

Pour des valeurs de C_2 très rapprochées de b , C'_1 n'est plus pratiquement mesurable.

Cette seconde façon de procéder correspond au *dosage indirect du complément*.

Poursuivons l'étude pratique de ces deux types de dosage de l'alexine.

A. DOSAGE DIRECT. — Le dosage direct de l'alexine est très employé en sérologie. Il consiste à sensibiliser les hématies à un certain taux et à rechercher la concentration minimum alexique donnant encore l'hémolyse totale. Plus la sensibilisation sera forte plus cette concentration sera faible. Or, nous avons déjà vu qu'il y a tout intérêt à se tenir au voisinage du seuil alexique. On est donc amené à sensibiliser fortement

les hématies, c'est-à-dire à utiliser une concentration en sensibilisatrice plusieurs fois supérieure à la concentration-limite (1). Voici les coefficients qu'emploient quelques auteurs :

Calmette et Massol.....	10
Sordelli-Miravent	5
Harrison-Wyler	6

Etant données les très faibles valeurs de la concentration-limite en sensibilisatrice, cet excès de sensibilisation n'introduit qu'une quantité infime de sérum de Lapin dans la réaction et ne peut la perturber, d'autant plus que cette introduction n'a lieu qu'au second temps, la réaction anticorps étant déjà effectuée.

La forte sensibilisation, c'est-à-dire le choix de C_1 dans la partie asymptotique de la branche d'hyperbole, présente les avantages suivants :

- 1° elle permet d'atteindre une valeur faible de C_2 , donc pratiquement le seuil alexique, ce qui est conforme au principe de *concentration alexique minimum* ;
- 2° elle supprime toute appréhension quant aux variations possibles de C_1 par suite d'inégalités d'adsorption de la sensibilisatrice par les hématies, au cours de la réaction. Dosage et réaction ayant lieu en présence d'un excès de sensibilisatrice, dans les mêmes conditions expérimentales, une variation importante sur l'axe des y correspond à une variation négligeable sur l'axe des x , où s'inscrivent les concentrations en alexine.

B. DOSAGE INDIRECT. — Moins employé que le précédent, il est utilisé par Debains et, à la suite de cet auteur, par Demanche.

Il consiste à choisir une valeur faible de concentration en alexine et à déterminer la concentration la plus faible en

1. Cette concentration-limite en sensibilisatrice est déterminée, au cours d'un dosage préalable, en présence d'un excès d'alexine.

sensibilisatrice donnant encore l'hémolyse totale. L'avantage de ce procédé est qu'à de faibles variations de C_2 , au voisinage du seuil, correspondent des variations beaucoup plus importantes de la concentration en sensibilisatrice, et que cette sorte de « démultiplication » rend plus précise la mesure. En réalité, celle-ci n'est pas aisée pour les valeurs alexiques trop rapprochées du seuil, parce que l'hémolyse totale et l'absence d'hémolyse sont reliées par toute une série d'états intermédiaires rendant difficile le choix de la concentration minimum. Cet inconvénient s'atténue pour des valeurs de C_2 plus éloignées du seuil alexique, et l'on parvient à déterminer avec précision les coordonnées d'un test fonctionnant bien à la limite de l'activité hémolytique.

L'avantage de cette méthode est de réaliser indirectement un dosage précis de l'alexine. Mais elle présente des inconvénients qui ne sont pas négligeables.

1^o L'activité alexique du sérum de Cobaye étant variable, il est nécessaire, si l'on veut avoir une activité à peu près constante, de mélanger les sérums de plusieurs Cobayes. Debains prescrit le mélange des sérums de six Cobayes au minimum. Demanche est plus exigeant : cinq à dix Cobayes mâles. C'est là une pratique applicable dans un laboratoire central de sérologie, où l'on exécute un grand nombre de réactions par semaine, mais que l'on peut difficilement imposer à un laboratoire non spécialisé et ne pratiquant pas la sérologie sur une aussi vaste échelle.

2^o Malgré la précaution précédente, l'activité alexique du mélange varie entre certaines limites. Aussi, la *dose fixe* choisie doit-elle être à une certaine distance du seuil, afin de ménager une zone d'évolution suffisante aux variations possibles du pouvoir alexique. Cet éloignement relatif du seuil est également imposé, nous l'avons déjà dit, par les conditions pratiques de la détermination de C_1 .

Il en résulte que la concentration alexique est plus forte par ce procédé que par le précédent, et que la sensibilité de la réaction s'en trouve diminuée.

D'autre part, la sensibilisation *effective* des hématies de-

mande à être faite avec précision, et toute variation dans l'adsorption de la sensibilisatrice par les globules, entre le moment du dosage et celui du second temps de la réaction, est susceptible d'entraîner des erreurs en dérégulant le test hémolytique.

Que ce soit par le procédé direct ou par le procédé indirect, le dosage de l'alexine ne doit pas tendre à déterminer un complexe hémolytique trop ajusté. Il est nécessaire qu'il y ait, dans tous les cas un certain excès d'alexine, afin de compenser la chute d'activité plus ou moins importante que subit le complément au cours du premier temps, par suite du séjour à l'étuve à 37°. Même quand la fixation se fait à basse température, ou sur la table du laboratoire, il est prudent de ménager un léger excès d'activité hémolytique qui représente une indispensable marge de sécurité. Il peut en résulter une diminution de la sensibilité, mais la réaction y gagne en spécificité. C'est là l'essentiel.

III. — La réaction-type.

A. CARACTÉRISTIQUES GÉNÉRALES.

Cette réaction destinée à l'usage courant devra être suffisamment sensible, *mais surtout parfaitement sûre*.

a) *Ce sera une réaction au sérum chauffé*, et non au sérum frais, pour les raisons suivantes :

1° Les procédés au sérum frais ne sont pas toujours applicables, les sérums pouvant être rapidement privés de toute activité hémolytique par disparition du complément ;

2° Ils ne permettent pas un dosage précis de l'activité alexique ;

3° Ils ne sont pas plus sensibles, dans la majorité des cas, que les procédés au sérum chauffé ;

4° Ils donnent lieu à des réactions de labilité, et, par conséquent, ne sont pas sûrs quant à la spécificité ;

5° Le chauffage à 56° stabilise le sérum, sans diminuer d'une façon appréciable la sensibilité des réactions bien réglées. Il permet un dosage précis de l'alexine. Il augmente la spécificité de la réaction.

b) *Ce sera une réaction à trois tubes-antigène* : le premier est réglé de façon à fournir le maximum de sensibilité compatible avec une bonne spécificité, c'est le *tube-sensibilité* ; les deux suivants donnent l'étendue de la réactivité du sérum, ce sont les *tubes-étendue*. Nous dirons au chapitre suivant pourquoi un seul tube ne peut remplir ces deux fonctions. La fixation de l'alexine étant le phénomène caractéristique de la réaction de Bordet-Wassermann, l'étendue de la réactivité syphilitique sera appréciée par la capacité de fixation du complexe antigène-anticorps pour l'alexine.

c) *Ce sera une réaction symétrique, type Calmette-Massol*. Il y a, en effet, deux causes d'erreur importantes en sérologie hémolytique : le pouvoir anti-complémentaire du sérum, le pouvoir anti-complémentaire de l'antigène. La seconde peut être éliminée facilement (préparation correcte, hautes dilutions, dosage du complément en présence de l'antigène) ; la première ne peut être écartée que par la comparaison, tube à tube, de deux réactions, avec et sans antigène.

Chaque tube-antigène aura donc son symétrique, ou tube-sérum, dont le degré d'hémolyse servira de repère pour apprécier correctement l'hémolyse du tube-antigène correspondant. Cependant, le troisième tube antigène n'aura pas de tube-sérum témoin, car celui-ci est parfaitement inutile. Etant donné l'excès de complément qu'il renferme, il est toujours hémolysé. Si les deux premiers tubes n'étaient pas hémolysés, le troisième le serait-il, qu'il ne fournirait aucune indication utile. La réaction doit être, en effet, lue à partir du premier tube, qui est le tube-sensibilité. Tout au plus, peut-on tolérer une hémolyse légèrement incomplète dans le premier tube-sérum, le second tube étant, bien entendu, hémolysé. Dans le cas d'un sérum négatif, il y a un

étroit parallélisme entre le tube-sensibilité et son témoin. Le témoin-sérum du premier tube-étendue est indispensable : 1^o il renseigne sur la bonne exécution de la réaction ; 2^o en cas d'hémolyse partielle du premier tube-sensibilité et de son témoin, il permet d'interpréter le degré d'hémolyse du premier tube-étendue ; 3^o il fournit un étalon d'hémolyse totale.

Le sixième et dernier tube de la réaction est un témoin d'inactivation du sérum ; il n'est pas indispensable, mais fournit un étalon d'hémolyse nulle.

La troisième série de témoins-antigènes peut être délibérément supprimée. Elle avait, dans le dispositif Calmette-Massol, une utilité à l'époque où l'anti-complémentarité des antigènes était à redouter. Actuellement, répétons-le, les antigènes du type Bordet Ruelens légèrement cholestérolés ne sont pas anti-complémentaires, et l'on éliminerait ce pouvoir, s'il existait, par le dosage de l'alexine en présence de l'antigène, pratique à laquelle on doit, d'ailleurs, systématiquement recourir.

Le dosage du complément sera du type direct, pour les raisons que nous avons précédemment énoncées. *L'antigène* sera un extrait alcoolique de myocarde de Veau, selon la technique Bordet-Ruelens, additionné de cholestérol dans la proportion de 0,3%.

B. LES RÉACTIFS.

1^o *L'électrolyte*. — Solution à 9^o 00 dans l'eau distillée (1) de chlorure de sodium cristallisé chimiquement pur (pH de la solution : 5,4).

2^o *L'alexine*. — Mélange des sérums de deux Cobayes mâles, adultes, à jeun, et en bonne santé.

La « qualité » du sérum de Cobaye intervient dans le phénomène de l'adsorption de l'alexine pour une part qui paraît

1. L'emploi de l'eau distillée est obligatoire. L'eau de source, bouillie ou non, filtrée ou non, renferme des sels de calcium qui insolubilisent les savons entrant dans la composition de l'antigène.

bien n'être pas toujours négligeable. Un produit à caractéristiques constantes devrait être constitué par le mélange des sérums de nombreux Cobayes, mais lorsque l'on recourt à ce moyen, il nécessite un élevage important de ces animaux sous peine de les ponctionner à intervalles trop rapprochés.

Dans la pratique, on constate que des Cobayes bien soignés donnent un sérum dont les propriétés sont d'une constance très satisfaisante. Ces animaux doivent être nourris, très attentivement et copieusement, avec du son, des épluchures et, surtout, avec des feuilles vertes. La présence d'un *végétal vert et frais* dans la ration alimentaire des Cobayes est absolument nécessaire si l'on veut qu'ils fournissent une alexine convenant aux réactions d'hémolyse. De plus, leur logement doit être proprement tenu, bien aéré, bien éclairé et chauffé en hiver. Pour qui serait tenté de trouver ces prescriptions ridicules, on rappellera que les causes d'erreurs en sérologie doivent être recherchées parfois fort loin, et que l'on ne saurait prêter trop d'attention à des détails en apparence infimes.

On peut, dans les laboratoires où il est fait une consommation importante de sérum, sacrifier les animaux par section de la carotide et recueillir leur sang. En général, il est plus pratique de prélever 10 cmc. à 20 cmc. de sang par ponction cardiaque, opération bien supportée quand elle est correctement exécutée. Un laps de temps d'un mois au moins — de deux mois si possible — devra séparer deux ponctions consécutives.

Les procédés de conservation de l'alexine permettent de ne procéder à la prise de sang que tous les quinze jours.

Les formules d'Austin (1907), Thompson (1916), Rhamy (1917) seront avantageusement remplacées par celle de Ronchèse, qui a le grand mérite de ne faire intervenir que NaCl et une proportion très faible de Quinosol.

L'emploi, de plus en plus généralisé dans les laboratoires, de frigorifiques électriques où la température se maintient entre 0° et 4°, rend aisée la conservation de l'alexine non diluée, sans aucune addition de produits chimiques. Pendant

quelques jours, on n'enregistre qu'une faible baisse de son activité.

En principe, on laisse la coagulation du sang se faire à la température du laboratoire pendant quelques heures, puis on place à la glacière pendant 12 heures pour stabiliser l'activité alexique. Le complément peut alors être employé.

Si l'on désire le conserver un certain temps, on le mélangera avec la solution de Ronchèse (1) dans les proportions suivantes.

Sérum de Cobaye.....	1 vol.
Solution de Ronchèse.....	1 vol. 5

Placer à la glacière. Au moment de l'emploi, diluer au 1/4 avec de l'eau distillée, en versant celle-ci dans le sérum par petites portions et en agitant soigneusement chaque fois, à cause de l'hydrolabilité de l'alexine. *Ne se servir de cette dilution qu'au bout d'une demi-heure, afin d'atteindre l'équilibre d'hydratation des molécules sériques et de se servir d'un produit stable dans son activité.*

3° *La sensibilisatrice.* — Le sérum hémolytique de Lapin anti-Mouton doit être préparé de la façon suivante.

1. Laver cinq fois de suite des hématies de Mouton au sérum physiologique, en les remettant chaque fois soigneusement en suspension et en attendant cinq minutes avant de les centrifuger à nouveau, cela dans le but de les débarrasser complètement du plasma. Les hématies ainsi lavées : 1° n'entraînent pas la formation d'agglutinines dans le sang du Lapin ; 2° ne provoquent pas d'accidents anaphylactiques chez l'animal traité.

2. Injecter à un Lapin mâle, par la voie intra-veineuse, 3 cmc. environ de la suspension globulaire, ramenée au volume normal. Répéter cinq fois de suite l'injection, à cinq

1. Chlorure de sodium chimiquement pur.....	5 gr. 40
Quinosol ou Sunnoxol.....	0 gr. 025
Eau distillée.....	q. s. p. 100 cmc.

jours d'intervalle, en diminuant chaque fois la dose de 1/2 cmc.

3. Cinq jours après la dernière injection, retirer 50 cmc. de sang, par ponction cardiaque. Chauffer le sérum 1/2 heure à 56° et le mettre en ampoules, ces diverses opérations étant conduites aseptiquement. Conserver les ampoules à la glacière.

4° *Les hématies.* — Le sang défibriné de Mouton en provenance des abattoirs sera filtré sur gaze, centrifugé et les hématies seront, après décantation, remises en suspension dans le sérum physiologique. On pratiquera successivement trois lavages, et l'on ramènera au volume primitif le dernier culot de centrifugation. Il est essentiel de ne pas centrifuger trop vite, afin de ne pas tasser les hématies les unes sur les autres, ce qui aurait pour effet de créer des altérations globulaires préjudiciables à la marche régulière de l'hémolyse.

Nous préférons, pour notre part, procéder de la façon suivante.

On centrifuge le sang défibriné dans un gros tube, puis on remet en suspension dans du sérum physiologique. On centrifuge à nouveau à faible vitesse, pendant une minute : on recueille la suspension et l'on jette le culot. Cette suspension est centrifugée, et on lave le culot deux fois de suite.

Cette centrifugation partielle a pour but de se débarrasser des agrégats d'hématies, plus ou moins enrobés de fibrine, qui introduisent des causes d'erreur au second temps de la réaction.

Enfin, on prépare, à partir des hématies ainsi lavées, une suspension que l'on ajuste à 20 % d'hémoglobine à l'aide de l'hémomètre à prismes de *Hellige*, appareil particulièrement pratique et d'un étalonnage constant.

5° *L'antigène.* — C'est un extrait alcoolique de cœur de Veau préparé selon la méthode classique de Bordet-Ruelens, avec des modifications de détails.

1. Passer à la machine à pulper deux ou trois cœurs de

Veau débarrassés, au préalable, de toute trace de graisse, des aponevroses, etc.

2. Traiter la pulpe par de l'alcool éthylique à 80° pendant deux jours, à raison de 125 cmc. d'alcool pour 100 grammes de cœur. L'alcool s'hydrate en quelques instants et son titre tombe à 50° ; à cette concentration, il ne dissocie pas le complexe protéino-lipoïdique.

3. Au bout de deux jours, on jette le tout sur un filtre, et l'on met la pulpe à sécher sur du papier-filtre à l'étuve à 37°. Il est bon de prolonger cette dessiccation pendant une quinzaine de jours, en renouvelant souvent la couche en surface.

On obtient ainsi une poudre bien sèche, dans laquelle certaines substances nuisibles sont insolubilisées (800 gr. de cœur frais fournissent 168 gr. de poudre). Cette poudre se conserve bien dans des tubes de verre scellés, à la glacière.

4. On pratique une extraction alcoolique de la poudre ainsi obtenue, après épuisement préalable par l'acétone ou par l'éther, à une température qui ne doit pas dépasser 15°.

a) *Extraction acétonique* : Traiter 20 gr. de poudre de cœur par 100 cmc. d'acétone, pendant une heure. Décanter, remettre 100 cmc. d'acétone, et laisser en contact pendant deux heures. Décanter à nouveau, traiter par 100 cmc. d'acétone pendant deux jours. Décanter et traiter, encore une fois, par 100 cmc. d'acétone pendant deux jours.

b) *Extraction éthérique* : Epuiser, quatre fois de suite et dix minutes chaque fois, 20 gr. de poudre de cœur par 50 cmc., 50 cmc., 100 cmc. et 100 cmc. d'éther anhydre.

Après dessiccation (48 h. à l'étuve à 37°), la poudre, traitée de l'une des deux façons précédentes, est épuisée pendant

1. Les solvants employés doivent être rigoureusement purs et livrés en flacons capsulés. Il est indispensable de se les procurer dans une maison de produits chimiques réputée, garantissant la pureté d'un produit de sa marque.

Il est à souhaiter que disparaissent des laboratoires de biologie ces produits de provenance douteuse, livrés par des intermédiaires peu scrupuleux en général.

La chimie-physique exige, avant toute autre chose, des produits purs. Dans ce domaine, économiser c'est accumuler volontairement les causes d'erreur.

8 jours, à la température du laboratoire, par l'alcool éthylique absolu, dans la proportion de cinq centimètres cubes d'alcool pour un gramme de poudre. Après *centrifugation*, on obtient l'extrait alcoolique définitif qui sera conservé en ampoules scellées ou dans un flacon bouché à l'émeri, à la température du laboratoire et à l'abri de la lumière.

On en prélèvera, au préalable, une partie qui sera cholestérolée à 0,3 %. Le cholestérol du commerce est un produit non purifié, qui introduirait dans la réaction des lipoïdes pouvant présenter une spécificité déterminée. Il sera donc indispensable de le purifier par cristallisation dans l'alcool. On pratiquera ainsi cinq cristallisations successives, et c'est ce produit, bien séché à l'étuve à 37°, que l'on ajoutera à l'extrait alcoolique.

Mode de dilution. — On a proposé de nombreux modes de dilution, et certains auteurs font intervenir dans cette opération un *tour de main* duquel dépend, paraît-il, la sensibilité de la réaction. Nous nous séparons entièrement de cette façon de procéder. Une réaction qui nécessite un *tour de main* n'est pas pratique pour l'usage courant.

Nous adoptons le mode de dilution de Kahn, qui est réellement automatique : il n'y a pas plusieurs façons différentes de l'exécuter.

On prend deux tubes à essai. On dépose, à l'aide d'une pipette, l'antigène *au fond* d'un tube et non sur les parois. On mesure dans le second tube la quantité de sérum physiologique nécessaire. On verse le contenu du second tube dans le premier et l'on transvase cinq ou six fois de suite.

L'extrait préparé de la façon précédente, en traitant, comme on l'a décrit, un mélange de pulpes provenant de trois cœurs différents, doit en général être dilué au 1/50. On obtient ainsi une solution limpide en lumière transmise, à peine opalescente par éclairage latéral.

La dilution réelle de cet antigène, sa dilution de réaction, est de 0,33 %. Celle de la réaction de Sordelli, rappelons-le, est de 0,40 %.

C. LES MESURES.

Il va sans dire que les diverses dilutions doivent être faites à l'aide d'éprouvettes et de pipettes très exactement graduées. La solution de chlorure de sodium sera préparée dans une fiole jaugée de 1 litre ou de 1/2 litre et en prenant soin d'opérer deux ou trois transvasements pour homogénéiser la solution.

La distribution des réactifs dans les tubes à hémolyse soulève une question épineuse : faut-il les mesurer en dixièmes de cmc. ou par gouttes ? Disons immédiatement que, contrairement à l'opinion actuellement répandue, nous nous rallions à la seconde façon de procéder.

Il suffit d'avoir vu travailler des laborantines « à la mesure » pour être édifié sur le degré de précision ainsi atteint. Le doigt se crispe sur la pipette, la colonne liquide descend par à-coups, le trait à peine atteint est déjà dépassé. Résultat : dans un tube 1, 3 et 0, 7 dans le suivant, erreur du simple au double. Il y a là un exemple frappant de l'inadaptation d'un procédé de mesure à la pratique réelle.

La distribution par gouttes ne présente que des avantages. Elle est rigoureusement automatique. Pour une pipette donnée et un liquide déterminé, les conditions de capillarité et de tension superficielle étant constantes, les gouttes sont égales entre elles.

Pour des raisons de commodité, l'inclinaison de la pipette est pratiquement toujours la même. Des variations marquées de cette inclinaison entraînent des différences qui atteignent, tout au plus, 1/50. L'erreur est négligable.

Tandis que la distribution au dixième de cmc. se fait toujours contre les parois du tube, les gouttes, au contraire, tombent directement au fond ; ainsi, aucune fraction d'un réactif ne se trouve soustraite à la réaction.

Ce mode de distribution est pratiquement plus précis, plus rapide, moins fatigant que l'autre. Il ne nécessite que certaines précautions élémentaires :

1° N'employer que des pipettes à pointe non ébréchée. Détruire systématiquement toute pipette sérologique abîmée.

2° Ne pas intervertir les pipettes au cours d'une même séance. Il suffit d'avoir une demi-douzaine de pipettes, chacune plongeant dans un tube à essai renfermant un réactif : à chaque réactif, sa pipette.

3° Etre confortablement installé et bien éclairé. Un court entraînement apprend à laisser tomber la goutte dans l'axe du tube.

4° De façon à respecter les proportions entre réactifs, les pipettes doivent toutes avoir, à l'extrémité inférieure, les mêmes diamètres intérieur et extérieur. Il suffit de se procurer des pipettes *normales*, débitant XX gouttes, en position verticale, par centimètre cube d'eau distillée.

Un autre mode de distribution peut être réalisé à l'aide du *rhéomètre de Vernes*. C'est un instrument particulièrement commode, dont nous nous servons systématiquement pour débiter le sérum physiologique. Demanche en a généralisé l'emploi, en réglant de telle sorte la dilution de ses réactifs que ceux-ci peuvent être distribués sous un volume uniforme de 0 cmc. 6. C'est là une technique intéressante, *pour le travail en série*, et elle a le mérite d'éliminer toute une catégorie de causes d'erreur.

D. LES DOSAGES.

Les dosages constituent la partie vraiment délicate et spécialisée de la technique sérologique. Il est cependant possible de les simplifier sans leur faire perdre de leur rigueur.

a) Dosage du sérum hémolytique. — Il a pour but la détermination du seuil de la sensibilisatrice en présence d'un excès d'alexine, dans le dispositif même du second temps de la réaction proprement dite (volume total V' et nombre d'hématies G). La détermination de cette concentration-limite sera approximative : nous utiliserons dans la réaction une concentration cinq fois plus forte, et nous serons ainsi

assurés d'employer l'*alexine* à son taux-limite tout en n'introduisant qu'un minimum d'albumine de Lapin.

Il est nécessaire que le sérum hémolytique soit très actif. Malgré un titre suffisamment élevé, son *adsorbabilité* peut être mauvaise, ou encore il peut manifester une affinité insuffisante pour l'*alexine*. Aussi, c'est par l'étude minutieuse comparative de plusieurs sérums anti-Mouton différents que l'on peut sélectionner une hémolysine douée de propriétés électives. Nous pensons que le sérum hémolytique, tout comme l'antigène, devrait être standardisé en vue d'une réaction-type officielle, et livré aux laboratoires après avoir été très sérieusement éprouvé, comparativement avec des sérums-étalons.

La détermination du titre se fera très simplement de la façon suivante:

On procède d'abord à des dilutions croissantes d'une solution-mère.

NaCl 9,3 ‰	4,5	4	3,5	3	2,5	2	1,5	1	0,5	0
Dilution-mère $\frac{1}{n}$.	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Titre	$\frac{1}{10n}$	$\frac{1}{9n}$	$\frac{1}{8n}$	$\frac{1}{7n}$	$\frac{1}{6n}$	$\frac{1}{5n}$	$\frac{1}{4n}$	$\frac{1}{3n}$	$\frac{1}{2n}$	$\frac{1}{n}$

On ne devra pas prendre $\frac{1}{n}$ inférieur à $\frac{1}{50}$ et rejeter tout sérum ne manifestant aucune activité à ce taux.

Dans une série de 10 tubes, on introduit :

- 15 gouttes de sérum physiologique à 9,3 ‰
- 1 goutte de l'une des dilutions précédentes
- 1 goutte de suspension globulaire (1)
- 1 goutte de sérum de Cobaye au 1/2.

On choisit la plus forte dilution, de droite à gauche dans

1. Standardisée comme il a été dit plus haut, cette suspension est au 1/6 environ.

le tableau précédent, donnant encore l'hémolyse complète au bout d'une demi-heure de séjour à 37°.

Le sérum hémolytique sera employé à une concentration cinq fois plus forte.

EXEMPLE : L'hémolyse est totale de $\frac{1}{n}$ à $\frac{1}{6n}$ inclusivement,

le tube $\frac{1}{7n}$ n'est que partiellement hémolysé. La dilution-mère étant au 1/50, le sérum hémolytique sera employé dans la réaction à la concentration de 1/60.

b) Dosage du complément. — On procèdera à ce dosage au début de chaque séance, suivant le protocole habituel, tel qu'il est consigné dans le tableau suivant.

NaCl à 9,3 ‰	0 cm ³ 5	0 cm ³ 5	0 cm ³ 5	0 cm ³ 5	0 cm ³ 5
Antigène au 1/50	3	3	3	3	3
Alexine au 1/12	1	2	3	4	—
Sérum hémolytique dilué ...	1	1	1	1	1
Suspension globulaire au 1/6	1	1	1	1	1

Placer au thermostat à 37°C pendant une 1/2 heure. Les quantités sont figurées en gouttes. Le sérum physiologique est distribué au rhéomètre.

Une particularité apparaît immédiatement : les volumes des différents tubes ne sont pas égalisés par addition de sérum physiologique.

L'uniformisation des volumes n'a ici aucune utilité. Il suffit que le volume du tube choisi, donnant l'hémolyse totale avec le minimum de complément, et le volume du tube-sensibilité de la réaction soient les mêmes. Or, la légère différence (2 gouttes de sérum suspect), en augmentant le volume du 1^{er} tube de la réaction proprement dite, compense le léger excès d'alexine dont s'accompagne ce genre de dosage du complément à grands intervalles.

Avec un tel dosage, la dilution de l'alexine est effectuée une fois pour toutes, et, précaution importante, aucune manipulation du complément ne se situe entre le dosage et la réaction. *C'est la solution, telle qu'elle a servi au dosage, qui est*

distribuée dans les tubes. Ainsi, aucune erreur de calcul ou de dilution n'est à redouter.

c) Dosage de l'antigène. — Cette expression, consacrée par l'usage, est mauvaise. Un antigène correctement préparé ne doit être ni anticomplémentaire, ni hémolytique. Ce sont là des particularités d'une époque sérologique révolue. Il doit supporter une dilution élevée et fonctionner au titre réel de 0,20 à 0,40 %. Un titre fixe de dilution, *standardisé*, présenterait de sérieux avantages. Il permettrait, notamment, de régler la réaction pour une proportion déterminée d'alcool éthylique, et de calculer le pouvoir relarguant de l'électrolyte en fonction de ce titre alcoolique fixe.

Le « dosage » se ramène donc, en réalité, à un *contrôle de sensibilité et de spécificité*. Cette épreuve doit être effectuée dans les conditions mêmes de la pratique sérologique, c'est-à-dire en présence de sérums partiellement positifs (correctement étiquetés du point de vue clinique) et en parallèle avec des antigènes étalons. La spécificité sera établie avec soin, à l'aide de sérums pathologiques divers et de sérums normaux.

Un laboratoire de médiocre importance ne saurait se livrer à une expérimentation d'une telle envergure. La seule solution à ce problème — le plus important de la sérologie — est la délivrance d'un antigène garanti par un *Institut central de Sérologie de l'Etat français*.

E. DISPOSITIF DE LA RÉACTION.

Le dosage du complément est mis en train aussitôt que les réactifs sont préparés. On dispose, pendant ce temps, les tubes dans les porte-tubes, on distribue le sérum physiologique au rhéomètre, à la dose fixe de 0 cmc. 5 dans tous les tubes, et l'on répartit les sérums suspects (1) — en se gardant bien d'ajouter l'antigène, « en attendant ».

1. On aura choisi le moment d'inactivation de telle sorte, qu'au sortir du bain-marie ils séjournent 1/4 d'heure à la température ambiante.

Au bout d'un séjour de 20 minutes à 1/2 heure à 37°, le dispositif de dosage du complément indique la dose-limite qui sera la quantité d'alexine au 1/12 employée dans le premier tube de la réaction. On procède alors à la distribution du complément, on secoue les portoirs, et l'on distribue en dernier lieu l'antigène. Celui-ci ne doit, en effet, entrer en contact avec le sérum qu'en présence de l'alexine (c'est là une des raisons de la prétendue sensibilité plus grande des procédés au sérum frais).

On place à l'étuve à 37°, pendant 45 minutes, puis à la température du laboratoire pendant 30 minutes, en secouant fréquemment. Cette façon de procéder donne une bien meilleure fixation de l'alexine, ainsi que nous avons pu nous en assurer par de nombreux essais comparatifs.

RÉACTION DE CALMETTE-MASSOL, PROPOSÉE COMME RÉACTION STANDARD (1).

	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>a'</i>	<i>b'</i>	<i>τ</i>
NaCl à 9,3 ‰ (1)	0 cm ³ 5	0 cm ³ 5	0 cm ³ 5	0 cm ³ 5	0 cm ³ 5	0 cm ³ 5
Sérum suspect inactivé (2). (20 ^m à 54°C)	2	2	2	2	2	2
Alexine au 1/12 (<i>n</i> = nombre de gouttes déterminé par le dosage)	<i>n</i>	<i>n</i> + 1	<i>n</i> + 2	<i>n</i>	<i>n</i> + 1	—
Antigène au 1/50	3	3	3	—	—	—
Placer 3/4 d'heure à 37°C, puis 1/2 heure à la température du Laboratoire, en agitant les portoirs toutes les dix minutes.						
Sérum hémolytique (dilué et titré)	1	1	1	1	1	1
Suspension globulaire . . . (Standardisée à l'hémomètre, environ au 1/6)	1	1	1	1	1	1
1/2 heure à 37° en agitant fréquemment.						
(1) Distribuer les réactifs dans l'ordre. Les quantités sont figurées en gouttes ; le sérum physiologique est réparti au rhéomètre.						
(2) Ou liquide céphalo-rachidien.						

Nous allons nous expliquer sur certaines particularités de ce dispositif.

1. Ce dispositif, qui résulte d'une modification d'une technique du type Calmette-Massol — utilisée notamment par E. Peyre — est en usage, depuis plusieurs années, dans deux laboratoires de l'Hôpital Saint-Louis. Sa spécificité est absolue, sa sensibilité très satisfaisante.

1° a , b ont leurs symétriques a' et b' , c' n'existe pas pour les raisons précédemment exposées.

2° T est un simple témoin d'inactivation du sérum. Son rôle est surtout de fournir un étalon d'hémolyse nulle. Il ne renferme pas d'antigène, parce que celui-ci n'est pas hémolytique, ainsi que le prouve le dosage du complément et son témoin.

3° Le sérum physiologique est distribué au rhéomètre de Vernes sous le volume constant de 0 cmc. 5, ce qui est très expéditif, et suffisamment précis. Les volumes ne sont pas égalisés, parce qu'il est inutile de le faire, comme la théorie le fait prévoir et l'expérimentation le confirme. Le seuil alexique ayant été déterminé par un dosage à part, ces légères différences de concentration ne se traduisent que par des différences négligeables dans la durée de l'hémolyse, de l'ordre de 1 à 2 minutes. D'ailleurs, la plus forte dilution se trouve réalisée dans le tube-réaction et ne peut que favoriser la fixation de l'alexine.

4° Le sérum hémolytique et la suspension globulaire ne sont pas mélangés à l'avance. Nous croyons que cette dernière pratique n'est pas sans présenter des causes d'erreur importantes, surtout quand elle est exécutée par un personnel non spécialisé. Les recherches que nous poursuivons actuellement sur ce sujet montrent que la sensibilisatrice, au fur et à mesure de son adsorption par les hématies, passe à l'état dissimulé dans le stroma. Il s'ensuit des variations de sensibilisation avec le temps et, ajouterons-nous, avec la température. *Il est préférable de se placer dans les mêmes conditions pour le dosage de l'alexine et pour la réaction.* La distribution d'une goutte d'anti-Mouton représente un travail supplémentaire insignifiant. Par contre, cette façon de procéder élimine des causes d'erreur, ce qui doit la faire prévaloir.

Les données métriques de cette réaction sont les suivantes :

1 goutte d'alexine diluée au $1/12 = 1/16$ du volume total du premier temps.

2 gouttes de sérum suspect = $1/8$ du volume total du premier temps.

3 gouttes d'antigène dilué au $1/50 = 1/6$ du volume total du premier temps.

1 goutte d'anti-Mouton dilué = $1/17$ du volume total du second temps.

1 goutte de suspension globulaire = $1/17$ du volume total du second temps.

Le tableau suivant donne les principales caractéristiques de la méthode, comparativement avec quelques procédés au sérum chauffé.

Caractéristiques	Sordelli-Miravent	Calmette-Massol « Standard »	Demanche	Debains	Harrison-Wyler
Sérum suspect (en % du vol. tot. du 1 ^{er} temps)	10	12	7	6	6,6
Antigène non dilué (en % du vol. tot. du 1 ^{er} temps)	0,40	0,33	0,23	0,50	2,20
Taux de dilution d'emploi de l'antigène	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{50}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{60}$	$\frac{1}{15}$
Rapport — Sérum de Cobaye	$\frac{1}{11}$	$\frac{1}{12}$	$\frac{1}{3,3}$	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{3,8}$
Concentration alexique au 1 ^{er} temps	9 ‰	8 ‰	23 ‰	31 ‰	16 ‰
Concentration de l'électrolyte	8,5 ‰	9,3 ‰	9 ‰	9 ‰	8,5 ‰
Température du 1 ^{er} temps ...	37°	37° 20°	20°	8°	20° 37°
Durée du 1 ^{er} temps	60 ^m	45 ^m 30 ^m	45 ^m	60 ^m	30 ^m 30 ^m

F. LECTURE ET NOTATION DES RÉSULTATS.

En principe, on lit les résultats au bout d'une demi-heure de séjour à l'étuve à 37°.

Pratiquement, on considère la réaction comme terminée, et les résultats comme définitifs, lorsque le degré d'hémolyse ne change plus dans les tubes, quels qu'ils soient. Nous ne faisons pas la lecture, en effet, « à la montre », mais au seuil (1). Une fois le seuil atteint, l'hémolyse ne varie plus, ou varie avec une telle lenteur que, pendant la durée de l'ob-

1. Se reporter au *second principe* du début de ce chapitre.

servation, qui n'excède pas 15 m. à 30 m. (à la suite du séjour de 30 m. à 37°), elle demeure inchangée pour l'observateur.

Cette façon de procéder rend la lecture facile et sûre. Lire les résultats aussitôt que les tubes-témoins sont hémolysés constitue une pratique détestable : elle est responsable de tous ces résultats douteux ou faiblement positifs qui ont failli discréditer la sérologie. *Seule, la fixité du degré hémolytique, contrôlé de cinq minutes en cinq minutes, est une preuve de fixation nette de l'alexine.*

Bien entendu, c'est par la comparaison de a avec a' et de b avec b' (voir le tableau de la réaction) que l'on verra s'il y a absence ou empêchement partiel de l'hémolyse.

Un rigoureux parallélisme entre les tubes-réactions et leurs témoins est habituel dans le cas de sérums négatifs.

En cas de positivité, plusieurs éventualités peuvent se présenter :

1° Les tubes-témoins sont tous hémolysés. Dans ce cas, une hémolyse partielle au 1^{er} tube doit être retenue comme indice d'une positivité faible, et ce résultat doit être soigneusement confronté avec les résultats du Hecht et du Kahn. S'il y a divergence, on refera l'examen, après réactivation s'il y a lieu, quelque temps plus tard.

Si l'hémolyse est nulle au 1^{er} tube et partielle au second, on se trouve en présence d'une syphilis évolutive, et son degré peut aller de cet aspect de la réaction à l'hémolyse nulle dans les trois tubes.

Il y a une grosse différence entre l'interprétation d'une hémolyse nulle dans le premier tube et celle d'une hémolyse nulle dans les trois tubes. Si, dans le premier cas, on ressent la nécessité d'appuyer le diagnostic sérologique sur d'autres réactions, dans le second la certitude de la positivité est quasi absolue.

Avec trois tubes suffisamment espacés, on ne met pas sur le même plan la positivité de la roséole et celle d'une hérédo-syphilis larvée.

2° Les tubes-témoins sont partiellement hémolysés. Le sérum, dans ce cas, est anti-complémentaire. Dans l'éventualité de sérums négatifs, l'aspect est identiquement le même en a , a' et b , b' . On ne retiendra, en faveur d'une faible positivité, que des différences absolument nettes H^2 en a , H^6 en a' , par exemple.

Si a' n'est pas hémolysé du tout, la réaction sera considérée comme débutant en b .

La notation des résultats devra comporter une représentation approchée du degré de l'hémolyse dans les trois tubes-réaction, suivant l'échelle de Jeanselme et Vernes (1). Etant donné la densité globulaire utilisée, le degré hémolytique est très facilement appréciable à première vue et sans qu'il soit nécessaire de recourir à des tubes-étalons. Cette représentation ne comporte d'ailleurs, empressons-nous de le dire, aucune précision. *Quelque approchée qu'elle puisse être, elle n'en est pas moins précieuse, parce qu'elle constitue la seule pièce à conviction de l'analyse sérologique, la photographie, dirons-nous, de la réaction.*

Un tel document doit figurer sur toute fiche de séro-diagnostic. Il sera suivi, cela s'entend, de l'interprétation personnelle du sérologiste.

La notation adoptée par la Conférence de Copenhague de 1928 manque de nuances dans la zone positive. A notre avis, trois degrés au moins de positivité doivent être retenus : réactions faiblement, partiellement et fortement positives. Ces expressions sont intelligibles au praticien et correspondent à des cas cliniques déterminés. Dans le premier cas, l'absence d'hémolyse ne se produit qu'au premier tube ; dans le second cas, elle se manifeste également dans le deuxième tube ; dans le troisième cas enfin, elle atteint le troisième tube.

Avec la technique que nous venons d'exposer, les réactions douteuses n'existent pratiquement pas. En cas de réaction

1. Cette représentation devra exprimer, cela va sans dire, la différence d'opacité entre chaque tube-réaction et son témoin. H^5 en a et H^5 en a' sera noté H^8 .

très faiblement positive, d'une interprétation embarrassante, les renseignements cliniques seront d'un grand secours. Ils devraient être joints systématiquement à toute demande d'analyse sérologique.

Le sérologiste et le clinicien doivent parler la même langue. Ils ne sauraient tolérer de cloison étanche entre le laboratoire et la pratique médicale proprement dite. Médecins tous deux, ils se doivent l'un à l'autre une franche et utile collaboration sur le plan commun de la Clinique.

CHAPITRE II

La pratique du séro-diagnostic de la syphilis.

I. — D'une doctrine sérologique.

La sérologie de la syphilis n'est pas encore en possession d'une doctrine très affirmée, à cause de son caractère d'extrême complexité et de l'incertitude qui subsiste quant à ses bases biologiques.

On a dit qu'elle constituait un art délicat et nuancé, et certains sérologistes très entraînés aiment à se servir de plusieurs réactions différentes comme d'un clavier dont ils tirent des appréciations diagnostiques fort subtiles.

Pour qui se place, cependant, au point de vue essentiel de la pratique quotidienne du séro-diagnostic, tel qu'il est effectué dans la plupart des laboratoires, il peut paraître souhaitable de voir cet art se transformer en une science aux règles précises.

A une époque encore récente, les procédés en usage n'étaient-ils pas aussi nombreux que les opérateurs eux-mêmes ?

Il semble, à considérer certaines variantes, que leurs auteurs n'aient pas eu suffisamment présente à l'esprit cette notion que les lois de la sérologie sont celles de la physique moléculaire et que le moindre changement apporté à un dispositif déterminé peut n'être pas sans inconvénients sérieux.

L'initiative d'une modification dans la technique habituellement employée peut, d'ailleurs, émaner d'un simple garçon

de laboratoire. Le fait n'est pas absolument exceptionnel. Les personnes chargées de la direction d'un laboratoire ne sont pas toutes également versées dans les choses de la sérologie. Il en est qui, étroitement spécialisées en anatomo-pathologie, en bactériologie ou en chimie analytique, préfèrent se reposer sur un subordonné, plus ou moins compétent, du soin d'entretenir quelque mystérieuse routine.

Or, les applications pratiques de la sérologie doivent être à l'abri des essais malheureux et des conceptions particulières erronées, comme de l'insuffisance technique ou de la fantaisie du personnel subalterne.

Aussi la nécessité s'est-elle fait sentir d'uniformiser, de codifier, d'organiser enfin la pratique du séro-diagnostic.

Sous l'égide de la Société des Nations, des Conférences internationales se sont réunies à plusieurs reprises dans le but de désigner des méthodes sûres. Depuis 1923, date de la première Conférence de Copenhague, de grands progrès ont été réalisés. Ils se manifestèrent surtout à la deuxième Conférence de Copenhague (1928) qui enregistra la supériorité des méthodes de floculation sur les diverses modifications de la réaction de Wassermann. Ces dernières se présentèrent dans des conditions beaucoup plus satisfaisantes à la Conférence de Montevideo (1930) où certains procédés, en particulier celui de Sordelli et Miravent, apparurent sensibles et spécifiques. Depuis, Debains et Demanche ont, de leur côté, mis au point de bonnes techniques.

Les résultats de ces conférences ont donné lieu à des recommandations de la Section d'Hygiène de la Société des Nations, qui résument assez bien les règles dont la pratique actuelle de la sérologie syphilitique est tenue de s'inspirer. *En particulier, il est conseillé d'effectuer pour chaque sérum deux ou trois réactions différentes, et non une seule (1).* « On

1. « Il est surprenant de constater, pouvait encore écrire Debains en 1932, que ces résolutions sont restées à peu près lettre morte en France. Beaucoup trop de sérologistes et de cliniciens (ceux-ci plus excusables) ignorent les résolutions des Conférences de Copenhague ; d'autres, mieux informés, n'en tiennent aucun compte et restent enlisés dans la routine des techniques périmées. »

E. Debains, *La Presse Médicale*, n° 76, 1932, p. 1435.

rencontre parfois des sérums réagissant positivement avec une méthode et négativement avec une autre qui, dans l'ensemble, est tout aussi sensible. Comme, en outre, il existe toujours certains sérums, peu nombreux, il est vrai, qui malgré la sensibilité généralement supérieure des méthodes de floculation réagissent cependant négativement avec ces méthodes, alors qu'ils donnent un Bordet-Wassermann positif, on pourra juger opportun d'employer une méthode de floculation et la réaction de Bordet-Wassermann (1). »

Ainsi, contrairement à ce que l'on fait parfois, en particulier à l'étranger, *il est dangereux d'employer exclusivement des méthodes de floculation*. Il est formellement indiqué de leur adjoindre une réaction de Wassermann.

Quelle que soit l'opinion que l'on ait sur le fondement biologique des réactions d'hémolyse, on ne saurait les considérer comme une simple modalité des réactions de floculation et renoncer à leur emploi sous le prétexte qu'elles sont d'une réalisation moins simple que ces dernières.

La spécificité de ces réactions, leur souplesse d'exécution, leur constance, leur facilité de lecture donnent à la pratique sérologique une grande sécurité. On a pu leur reprocher une sensibilité moindre que celle de certaines réactions colloïdales : cette marge est très réduite dans les bonnes techniques modernes. Et n'oublions pas que ce sont les réactions du type Wassermann qui tranchent le débat dans les cas litigieux.

Inversement, certains sérologistes, surtout en France, continuent d'ignorer les méthodes de floculation. Il est incontestable que l'on peut s'en passer plus aisément que des méthodes d'hémolyse. Cependant, elles donnent des renseignements utiles et sont d'une technique simple, pour la plupart.

1. Recommandations concernant les séro-réactions dans la syphilis. Rapport adopté par le Comité d'Hygiène au cours de sa XIX^e session (octobre 1932).

Bull. trim. de l'Organisation d'Hygiène de la S. D. N., 1932, n° 4.

2. Les réactions d'hémolyse n'ont donné, au cours de la large expérimentation à laquelle s'est livrée la Conférence de Montevideo, aucun résultat positif en dehors de la syphilis.

En définitive, l'opinion la plus généralement admise, aujourd'hui, est que tout diagnostic sérologique doit reposer, à la fois, sur les méthodes d'hémolyse et sur celles de flocculation.

Quels procédés choisir ? Comme le dit Demanche, il semble que la sérologie ait atteint un palier où les méthodes principales se rejoignent avec des résultats sensiblement équivalents ; tout au moins, préciserons-nous, quand elles sont exécutées par leurs promoteurs : c'est là une réserve importante.

Le choix d'une technique doit être dominé beaucoup plus par la préoccupation de la spécificité que par celle d'une extrême sensibilité. Un autre élément, dont il faut tenir le plus grand compte, est, avec la facilité d'exécution, la valeur du facteur personnel qui intervient dans cette exécution ainsi que dans l'interprétation des résultats. *Moins ce facteur sera élevé, meilleure sera la réaction. En ce qui concerne la réaction-type, il faut tendre le plus possible vers l'automatisme des manipulations et de la lecture.*

MÉTHODES D'HÉMOLYSE.

I. — Réactions au sérum non chauffé.

- a) avec dosage de l'activité hémolytique naturelle ;
- b) sans dosage de l'activité hémolytique naturelle.

II. — Réaction au sérum chauffé.

A. Réglage du test hémolytique par :

- a) ajustement de la sensibilisatrice en présence d'une dose fixe d'alexine ;
- b) ajustement de l'alexine en présence d'une sensibilisation constante des hématies.

B. Appréciation de la capacité de fixation des sérums suspects :

- a) doses croissantes d'antigène,
- b) doses croissantes d'alexine,
- c) doses décroissantes de sérum.

A. — RÉACTIONS AU SÉRUM NON CHAUFFÉ.

A l'époque où l'on tenait ces réactions pour beaucoup plus sensibles que les réactions au sérum chauffé, nombre d'auteurs se sont ingéniés à trouver un dispositif dans lequel fût réalisé un dosage satisfaisant de l'activité hémolytique naturelle du sérum frais. Employées sans ce dosage, ces méthodes sont susceptibles de fournir des résultats faussement positifs ou négatifs, étant donné les différences considérables que l'on observe dans la teneur en alexine et en sensibilisatrice des divers sérums, suivant leur provenance et la date de prélèvement.

La technique originale de Hecht (1909), à trois tubes, est encore pratiquée dans de nombreux laboratoires, et non des moindres, parce qu'elle est expéditive et ne nécessite ni alexine de Cobaye, ni sérum anti-Mouton. Pour commode qu'elle soit, c'est, sous sa forme primitive, une mauvaise réaction. Seul, le Hecht avec dosage, de Mutermilch, devrait être employé.

Les autres réactions au sérum frais sont : ou trop compliquées — et le principal intérêt de la méthode, qui est la simplicité technique, s'évanouit ; ou réalisent un dosage beaucoup trop serré, et sont susceptibles de donner des positivities erronées.

La méthode de Hecht-Mutermilch, employée à l'Institut Pasteur de Paris, a fait preuve de hautes qualités à la 1^{re} Conférence de Copenhague (1923). A. Ravelo, qui l'a étudiée comparativement avec les méthodes de Debains, Demanche, Harrison-Wyler, Sordelli et les principaux procédés de floculation, sur un ensemble de 416 sérums, lui attribue un coefficient de non-spécificité de 1, 9 % et une sensibilité légèrement inférieure à celle de certaines techniques au sérum chauffé, fonctionnant avec un antigène cholestérolé.

Ici, il est essentiel de se servir d'un antigène qui, à la

dose employée, soit rigoureusement *non anti-complémentaire*. Mutermilch emploie exclusivement l'antigène de Bordet-Ruehlens, sans addition de cholestérol.

Ainsi pratiqué, le Hecht-Mutermilch présente les caractéristiques suivantes :

1^o Il est d'apparition précoce au cours de la syphilis primaire où il peut se manifester dès le 10^e jour. En outre, il serait plus résistant au traitement et plus constant dans les syphilis latentes.

2^o Il donne à basse température des réactions non spécifiques, aussi les réactifs conservés à la glacière devront-ils séjourner un certain temps sur la table du laboratoire avant leur emploi.

3^o Si l'on ne recherche pas une extrême sensibilité, *les réactions négatives ont une réelle valeur*. Les réactions positives, quand elles sont totales, concordent en règle générale avec les techniques au sérum chauffé et les procédés de floculation. Mais quand elles sont partielles, il est nécessaire de les confronter soigneusement avec les résultats fournis par les autres méthodes.

4^o Toute réaction partiellement positive, non confirmée par les procédés au sérum chauffé ou le Kahn, est sujette à caution, étant donné les réactions de labilité de certains sérums frais (gravidité, tuberculose, etc.).

La réaction devra être pratiquée de vingt-quatre à quarante-huit heures après le prélèvement du sang, celui-ci sera conservé à la glacière pendant l'intervalle, afin d'éviter une chute trop rapide de l'activité alexique.

B. — RÉACTIONS AU SÉRUM CHAUFFÉ.

Plus sûres que les précédentes, ce sont les seules réactions d'hémolyse qui aient été représentées aux Conférences de Copenhague (1928) et de Montevideo (1930). Elles présentent, en effet, les avantages suivants sur les réactions au sérum frais :

- 1^o le chauffage à 56° « stabilise » le sérum et accroît nettement la spécificité de la réaction ;
- 2^o la concentration en alexine peut être réglée avec précision et fixée au taux le plus favorable ;
- 3^o l'étendue de l'infection syphilitique est beaucoup plus aisément évaluée ;
- 4^o des réactions successives concernant un même individu sont comparables entre elles, étant donnée la constance des dosages (1).

Cela explique que les réactions au sérum chauffé aient fait l'objet d'un effort tout particulier, afin notamment de les mettre, du point de vue de la sensibilité, au niveau des procédés de floculation.

Ainsi sont nées d'excellentes techniques, mais dont les mérites respectifs sont loin d'être équivalents, lorsqu'on les considère sous l'angle de la constance, de la maniabilité, de la spécificité.

Nous ne pouvons entrer ici dans une critique détaillée des principales méthodes modernes, ce qui nous entraînerait en dehors des limites de cette brève étude, mais nous donnerons les caractéristiques, intéressantes du point de vue doctrinal, des quatre meilleures d'entre elles.

a) Méthode de Sordelli-Miravent. — Sordelli, directeur de l'Institut bactériologique du Département d'Hygiène de Buenos-Ayres, et Miravent, chef de la section de Sérologie de ce même Institut, ont mis au point une technique expérimentée, en 1930, à Montevideo, et recommandée par le Comité d'Hygiène de la S. D. N.

Caractéristiques : Dispositif symétrique à doses croissantes de complément, genre Calmette-Massol, mais avec un tube de sensibilité comportant une dilution de l'antigène cinq fois plus grande que celle qui est employée dans les autres tubes.

1. En présence d'un excès de sensibilisatrice, l'alexine peut être dosée avec une suffisante précision par rapport à l'étalon physico-chimique constant que représente l'hématie.

Antigène Bordet-Ruelens non cholestérolé, mis en suspension dans l'eau salée après évaporation de l'alcool. La proportion entre le sérum suspect et l'antigène brut est celle du Kahn (4 %). Haut degré de spécificité, grande sensibilité, apparition précoce au cours de la syphilis primaire.

b) Méthode de Harrison-Wyler. — Le procédé de Harrison (1918), modifié par E. J. Wyler (1922), a été recommandé par le Comité d'Hygiène de la S. D. N. Il a été adopté, en Angleterre, par le Ministère de l'Hygiène.

Caractéristiques : Dispositif à quatre tubes seulement, à doses croissantes de complément, comportant un contrôle de limite inférieure de l'activité hémolytique. L'antigène est un simple extrait alcoolique de cœur humain, cholestérolé au moment de l'emploi. Moins sensible que la précédente, plus compliquée, un peu moins spécifique.

c) Méthode de Debains. — Présentée en mars 1932, à la *Société de Sérologie et de Syphilis expérimentale*.

Caractéristiques : Un tube réaction unique. Ajustement de la sensibilisatrice anti-mouton sur une dose fixe d'alexine. Emploi d'une très petite quantité de sérum suspect. Fixation à 7°-8° C. dans une cuve-glacière. Antigène cholestérolé. Très sensible, mais un peu moins spécifique que les deux précédentes.

d) Méthode de Demanche. — R. Demanche a publié, en 1934, une technique inspirée de celle de Debains et adaptée plus particulièrement aux réactions en grande série des laboratoires centraux.

Caractéristiques : Réglage du test hémolytique par ajustement de la sensibilisatrice sur une dose fixe d'alexine. Emploi de deux antigènes, l'un simple, l'autre cholestérolé (1). Un tube-réaction par antigène. Encadrement de la réaction par deux tubes-témoins marquant les limites inférieure et supérieure de l'activité hémolytique. Réaction strictement spéci-

1. Demanche, à l'instar de Sordelli, emploie des antigènes très dilués, au 1/200.

fique mais peu sensible avec l'antigène simple ; aussi sensible que celle de Debains, mais plus spécifique, avec l'antigène cholestérolé.

Ces quatre techniques ont un complexe hémolytique très ajusté. Les deux premières emploient le dosage direct de l'alexine, les suivantes ont recours au dosage indirect. Nous avons discuté assez longuement les différents procédés de réglage du test hémolytique, pour qu'il n'y ait pas lieu d'y revenir. La température de fixation a été également étudiée au chapitre précédent. Nous ne voulons envisager, ici, que deux points particuliers concernant le dispositif technique des séro-réactions.

1° Peut-on, sans inconvénient, réduire à un seul le nombre des tubes-réactions ?

La positivité d'un sérum, c'est-à-dire son potentiel de réactivité, s'étend depuis les faibles valeurs, que décèlent les procédés très sensibles, jusqu'aux fortes valeurs qui caractérisent la syphilis secondaire. Détecter une faible réactivité, au cours d'une syphilis primaire ou d'une syphilis en traitement, est affaire de sensibilité de la réaction, et c'est là une de ses qualités les plus précieuses. Un seul tube y suffit. Nous l'appelons *tube-sensibilité*. Nous nous sommes déjà expliqué sur la détermination rationnelle de ses caractéristiques. Mais est-il possible de se servir de ce même tube pour apprécier *grosso modo* l'étendue de l'infection ? Posons immédiatement cette question subsidiaire : y a-t-il un intérêt clinique à introduire des degrés dans la positivité ? On ne saurait répondre à cette dernière question que par l'affirmative. Que ce soit au début de la maladie, au cours du traitement ou pendant l'évolution d'une syphilis latente, le clinicien a besoin de connaître approximativement l'*intensité sérologique* de l'affection.

Le rapport du D^r Moersch au Comité d'hygiène de la S. D. N. s'exprime, à ce propos, en ces termes : « Certains cliniciens soutiennent que le titrage quantitatif est certainement utile

pour se faire une idée de l'efficacité d'un traitement anti-syphilitique. En règle générale, sous l'action d'un traitement approprié, la réaction positive se transforme progressivement en réaction négative et le titrage quantitatif de la réaction montre par une diminution graduelle de son intensité que le traitement est efficace, bien avant qu'on obtienne une réaction négative. »

E. Peyre, à la suite de Dujardin, a cherché à exprimer en unités Σ le degré de réactivité des sérums syphilitiques, par l'emploi de quantités décroissantes de sérum. Il s'agit là d'une réaction quantitative spéciale, qui peut rendre de grands services, mais ne constitue pas un procédé de base.

Sans prétendre à une précision mathématique, mais en recherchant une simple évaluation, Calmette et Massol déterminent le nombre d'unités alexiques fixées, et cela au cours de la réaction qualitative ordinaire.

Debains ne se sert que d'un tube, Demanche emploie également un tube par antigène. « L'intensité des réactions positives est suffisamment appréciée à l'examen direct d'après l'opacité des tubes II et III (deux antigènes de sensibilité inégale) » (Demanche).

Or, que se passe-t-il dans un tube où l'activité alexique a été réglée au seuil hémolytique? L'absence d'hémolyse signifie évidemment le passage au-dessous du seuil, mais comment interpréter, au point de vue physico-chimique, l'hémolyse partielle? Celle-ci ne peut correspondre qu'à des seuils étagés de plusieurs lots différents d'hématies, lots inégalement fragiles ou adsorbant inégalement alexine ou sensibilisatrice. A moins de sensibiliser différemment, à dessein, plusieurs lots d'hématies, ces seuils, ainsi qu'on peut s'en assurer expérimentalement, sont situés très près les uns des autres. Il s'ensuit que l'hémolyse totale et l'absence complète d'hémolyse ne peuvent être très éloignées l'une de l'autre, et que, par conséquent, les états intermédiaires se situent sur une courte distance.

Un seul tube, réglé en vue d'une grande sensibilité, indiquera au plus le début de la phase sérologique franchement

positive. Il ne saurait fournir aucune indication sur l'étendue de celle-ci.

Les réactions au sérum chauffé qui n'emploient qu'un tube sont dans le cas du Hecht : elles peuvent être sensibles, mais elles sont incomplètes, parce que leur gamme de positivité est trop limitée. L'emploi de deux antigènes inégalement sensibles introduit des degrés dans la sensibilité et non dans l'étendue de la réactivité.

De plus, la précarité d'une réaction à un tube-antigène est difficilement contestable C'est là une pratique exceptionnelle, qui ne saurait être légitimée que par les nécessités de la « grande série » : économie de temps et simplification des manipulations.

L'emploi de trois tubes-antigène, renfermant des quantités croissantes d'alexine, tel qu'il est réalisé dans la réaction-type de Calmette et Massol décrite au chapitre précédent, présente les avantages suivants :

1. Le premier tube, ou tube-sensibilité, peut être aussi étroitement *ajusté* qu'on le désire ; la densité globulaire peut être diminuée jusqu'à la limite compatible avec une observation aisée, et, par conséquent, la concentration alexique peut être abaissée parallèlement, réalisant ainsi une des conditions de sensibilité sur lesquelles nous avons déjà attiré l'attention.

2. L'absence d'hémolyse dans les tubes suivants, ou tubes-étendue, *qui renferment un excès connu d'alexine*, donne une grande sécurité quant à l'interprétation d'une hémolyse nulle dans le premier tube.

3. L'emploi de trois tubes réduit considérablement les causes d'erreur ; c'est une garantie incontestable, même lorsque la réaction est effectuée par un personnel particulièrement entraîné ; il introduit, dans le diagnostic sérologique, des catégories qui ont leur correspondance clinique ; il permet de suivre avec une suffisante précision les effets du traitement.

2° L'usage de plusieurs antigènes donne-t-il une garantie supplémentaire ?

Certains sérologistes emploient systématiquement deux et même trois extraits antigéniques par réaction. La méthode officielle allemande de 1919 prévoyait l'usage simultané de trois extraits différents. Que doit-on penser de cette pratique ? Il semble bien qu'elle n'ait fait preuve d'aucune supériorité aux Conférences internationales de 1923, 1928 et 1930.

« Les méthodes basées sur l'emploi simultané de plusieurs antigènes n'ont pas fourni de meilleurs résultats que celles dans lesquelles on n'a employé qu'un seul antigène. D'excellents résultats ont été obtenus avec des extraits cholestérinés de cœur de Veau, de cœur de Bœuf et de cœur humain. Les extraits de foie syphilitique ne présentent aucun avantage par rapport aux extraits précités, plus faciles à obtenir : au contraire, ils ont parfois donné des résultats non spécifiques (1). »

L'emploi de plusieurs extraits complique bien inutilement la réaction. En cas de divergences, auquel se fier ?

Il est plus rationnel de préparer correctement plusieurs extraits et de sélectionner parmi eux le plus sensible et le plus spécifique. C'est cet antigène qui sera employé à l'exclusion des autres.

En réalité, la préparation de l'antigène de Bordet-Ruelens, tel que nous l'avons exposée au chapitre précédent, donne un extrait toujours égal et vraiment excellent. Il est essentiel de procéder avec la plus grande minutie dans les extractions successives, et surtout — point capital — d'utiliser des solvants rigoureusement purs.

Demanche emploie deux fois le même antigène : avec et sans addition de cholestérol. Le taux en cholestérol n'étant pas élevé, son antigène cholestérolé est, à la fois, sensible et spécifique. Par contre, l'antigène non cholestérolé manque nettement de sensibilité. Cependant, il arrive, d'après cet auteur, que cet antigène non cholestérolé donne des résultats

1. Rapport sur les Conférences sérologiques de 1923, 1928 et 1930, adopté par le Comité d'Hygiène de la Société des Nations, octobre 1932.

positifs, alors que l'antigène cholestérolé réagit négativement, et cela au cours de la période primaire plus particulièrement. Nous avons observé un fait analogue, au cours d'une série de réactions (Calmette et Massol) effectuées à l'aide de deux antigènes, l'un simple, l'autre cholestérolé. Un sérum, provenant d'un sujet porteur d'un chancre syphilitique au 15^e jour, donna une réaction partiellement positive avec le premier, négative avec le second. On sait, d'autre part, que la réaction de Sordelli Miravent, qui n'emploie qu'un seul antigène non cholestérolé, est particulièrement précoce au cours de la syphilis primaire.

Il y a là un point particulier de l'emploi des antigènes cholestérolés qui demanderait à être étudié systématiquement.

La triade que nous préconisons : Hecht-Mutermilch (antigène non cholestérolé) + Calmette-Massol (antigène cholestérolé) + Kahn ne serait pas, en l'occurrence, prise en défaut. La positivité isolée du Hecht, à supposer que les deux autres réactions fussent négatives, serait facilement interprétée à l'aide des renseignements cliniques.

Réactions d'extrême sensibilité. — Certaines réactions au sérum chauffé, à complexe hémolytique très étroitement ajusté, sont extrêmement sensibles. Il en est de même des procédés au sérum frais de Rubinstein ou de Renaud, dispositifs rigoureusement symétriques à dosage indirect très serré du complément.

Les résultats négatifs, obtenus à l'aide des réactions précédentes — à condition que l'antigène soit également très sensible — ont une incontestable valeur. Il n'en est malheureusement pas de même des réactions positives faibles.

Dans ses *Recommandations concernant les séro-réactions dans la syphilis*, le Comité d'Hygiène de la S. D. N. met en garde contre les réactions extrêmement sensibles :

« Il n'y a pas de limites nettes entre une réaction spécifique caractérisant la syphilis et une réaction non spécifique. Lorsque la sensibilité de la méthode augmente, on risque

toujours d'obtenir une réaction positive avec d'autres maladies que la syphilis, notamment lorsqu'il s'agit d'états s'accompagnant d'une modification de la stabilité sanguine. »

Il est absolument nécessaire de laisser un certain « jeu » dans l'ajustement du complexe hémolytique, sous peine d'obtenir des réactions non spécifiques. Il se peut que de telles réactions apparaissent plus sensibles quand elles sont exécutées dans des services spécialisés en vénéréologie, à cause de la prédominance, dans ces services, des cas de syphilis et de la rareté des autres affections. Tout résultat positif, dans ces conditions particulières, est accueilli avec faveur et porté à l'actif de la méthode.

En réalité, les procédés ultra-sensibles sont des procédés infidèles. Tout au plus peuvent-ils être considérés comme ayant une simple valeur *présomptive*, dans le cas, bien entendu, de résultats positifs isolés, car les réactions négatives, répétons-le, conservent leur entière signification.

Parmi les réactions sensibles, celle de Desmoulière jouit d'une grande réputation dans les milieux spécialisés. C'est une réaction d'une exécution délicate, par le dosage minutieux du complément ainsi que par l'emploi d'un antigène cholestérolé anti-complémentaire.

La réaction de Desmoulière est incontestablement très sensible. Il est non moins incontestable qu'elle est loin d'être spécifique, tout au moins sous sa forme originale. Il y a, en effet, plusieurs façons d'exécuter le Desmoulière, comme il existe plusieurs antigènes différents, dits de Desmoulière.

En réalité, le Desmoulière pouvait être tenu pour particulièrement sensible à l'époque où les réactions au sérum chauffé manquaient de sensibilité. Actuellement, les bonnes techniques modernes sont très voisines de la réaction de Desmoulière, qui leur a servi d'exemple. Elles emploient, comme cette dernière, un antigène cholestérolé et elles réalisent un dosage très précis de l'alexine.

Il convient, par conséquent, de s'entendre quand on parle

d'un Desmoulière : *s'agit-il de la technique primitive, ou simplement d'une réaction utilisant un antigène cholestérolé ?*

Lopez-Ruiz a récemment collationné dans le service du professeur Gougerot, à l'hôpital Saint-Louis, un certain nombre d'observations qui prouveraient la supériorité du Desmoulière sur le Bordet-Wassermann et le Hecht, du point de vue de la sensibilité. Mais, cet auteur ne fournissant aucun protocole technique, on ignore la valeur réelle des réactions-témoins et il est difficile de tirer une conclusion nette de ce travail.

En définitive, les réactions modernes appartiennent à la famille du Desmoulière par leur antigène cholestérolé et le réglage précis du test hémolytique. La réaction primitive de Desmoulière, avec son antigène fortement cholestérolé, ne peut qu'être considérée comme une réaction présomptive. A ce titre, elle pourra rendre des services dans certains cas spéciaux.

Nous en dirons autant de la *réaction de Jacobsthal* : gain de sensibilité aux dépens de la spécificité ; emploi réservé à des cas particuliers (contrôle du traitement, hérédo-syphilis).

C. — RÉACTIONS DE FLOCCULATION.

Les réactions de flocculation sont fort nombreuses et, de par leur principe même, il semble que l'on puisse en augmenter indéfiniment le nombre.

Le choix, malgré cette grande richesse en procédés divers, est ici particulièrement aisé. L'expérience de la pratique sérologique dans les principaux pays et les résultats des Conférences sérologiques internationales désignent la méthode de Kahn comme étant la meilleure.

A Montevideo, la réaction de Kahn *Standard* (regular test) a été rigoureusement spécifique : tout au plus a-t-elle donné 2 résultats douteux sur 304 cas non syphilitiques. De plus, elle s'est montrée remarquablement sensible (63,9 %) et s'est classée en tête des méthodes spécifiques.

« Elle peut être considérée, écrit Demanche dans sa *Technique du séro-diagnostic de la syphilis*, comme la méthode-type des réactions de floculation et même comme la réaction fondamentale de la syphilis. Elle le doit non seulement à sa sensibilité et à sa spécificité, mais encore à la rapidité et à la netteté de ses résultats, et à la simplicité de sa technique. »

La simplicité de sa technique, surtout, doit la faire préférer à des procédés aussi sensibles, ou même plus sensibles bien que moins spécifiques, mais infiniment plus compliqués.

Quelles que soient les qualités du Kahn, il peut donner un résultat négatif en pleine syphilis évolutive, alors que le Bordet-Wassermann est fortement positif. Ces cas sont rares, sans doute, mais on peut être amené à les rencontrer. Ils mettent en valeur, une fois de plus, la solidité du Bordet-Wassermann.

Le syndrome sérologique minimum. — Tout diagnostic sérologique de la syphilis, avons-nous déjà dit, doit s'appuyer sur les procédés d'hémolyse et sur ceux de floculation. Nous croyons que les premiers conservent une grande supériorité sur les seconds, malgré leur apparence de moindre sensibilité, car ils offrent une incontestable garantie de sécurité.

Le syndrome sérologique minimum sera donc constitué par deux procédés d'hémolyse auxquels viendra s'adjoindre un procédé de floculation. Un de ces procédés d'hémolyse sera obligatoirement au sérum chauffé, l'autre pourra être un procédé au sérum frais. Nous avons déjà exposé les raisons pour lesquelles notre choix se porte sur les réactions suivantes :

Calmette et Massol Standard,
Hecht-Mutermilch,
Kahn-Standard.

Cette triade constitue, à notre avis, un minimum que tout laboratoire d'analyses médicales devrait être en mesure d'exécuter correctement.

Si l'analyse sérologique devait être plus approfondie, il faudrait, alors, avoir recours aux *réactions présomptives* :

Desmoulière,
Jacobsthal,
Rubinstein, etc.

pour les réactions d'hémolyse. En ce qui concerne les réactions de floculation, on s'adresserait plus particulièrement aux suivantes :

Kahn (presumptive procedure);
Meinicke (M. K. R. II, micro-réaction et clarification).

Cette dernière, d'après Demanche, devrait être employée systématiquement pour le diagnostic des chancres.

Enfin, mentionnons les *réactions quantitatives* : méthode des dilutions de E. Peyre (réaction d'hémolyse) ou de Kahn (réaction de floculation); méthode graphique de Vernes, etc.

II. — La standardisation du séro-diagnostic.

Quand on considère la sérologie telle qu'elle est pratiquée dans nombre de laboratoires et officines qui s'occupent d'analyses médicales, on peut être amené à déplorer l'absence, dans notre pays, de toute organisation sociale concernant le séro-diagnostic de la syphilis.

Une question intéressant aussi directement la santé publique a vivement préoccupé certains gouvernements étrangers.

Il y a quelques années, le Ministère de l'Intérieur du Reich a édicté des prescriptions concernant les réactions sérologiques (1). Les établissements médicaux et les médecins autorisés à pratiquer ces examens y trouvent la marche à suivre pour l'exécution d'une réaction-standard. Naturellement, la

1. La Circulaire de 1920 établissait un contrôle sévère sur les laboratoires de sérologie. On y exposait les qualités requises pour avoir le droit de pratiquer les séro-réactions, et l'on prescrivait de n'employer que les extraits antigéniques provenant de l'*Institut de Thérapeutique expérimentale de Francfort*.

méthode officielle est considérée comme un minimum ; elle ne fera pas exclure d'autres procédés qui ont fait leurs preuves. Ceux-ci, spécifie la circulaire, devront être mentionnés explicitement et seront effectués par le sérologiste, qui en a le libre choix, comme il l'entend et sous son entière responsabilité (1).

En d'autres pays également (2), il a été donné des directives officielles touchant le séro diagnostic. Mais nous devons constater qu'en général ce problème n'a pas reçu de solution satisfaisante : tout au plus peut-on parler de conseils, dont quelques-uns reflètent une opinion particulière, enrobés dans une très vague et très élastique réglementation.

Il nous paraît que la question est, trop souvent, mal posée. Les circulaires auxquelles il a été fait allusion plus haut, si l'on en excepte la circulaire allemande, s'adressent aux personnes qui pratiquent la sérologie comme s'il s'agissait toujours de sérologistes professionnels, et en cherchant à ménager leur susceptibilité. Or, il n'est que faire ici de distribuer des conseils, quelque courtois et nuancés qu'ils puissent être. On peut être assuré qu'ils seront oubliés aussitôt qu'entendus.

Il ne s'agit pas d'autre chose, en réalité, que d'exposer d'une façon objective le protocole clair et complet d'une méthode *standard*, parfaitement adaptée à la petite et moyenne série et de fournir le matériel et les réactifs *officiels* qui s'y rapportent.

L'exemple le plus démonstratif n'est-il pas donné par le Kahn, type de la réaction de flocculation standardisée ?

La technique est *ne varietur*, le matériel spécialisé est fabriqué d'après un modèle unique, l'antigène porte une double estampille qui est un sûr garant de sa valeur réelle.

La standardisation des procédés d'hémolyse soulève donc

1. Décret du Ministre de l'Intérieur du Reich du 18 octobre 1934, modifiant la Circulaire du 24 août 1920.

2. Cf. « The Standard procedure of the American Public Health Association », *Am. J. Publ. Health.*, 24 juillet 1934, p. 727-731 et Great Britain Ministry of Health : « On serological test for syphilis », 1934.

deux questions connexes : l'élaboration d'une méthode-type et la préparation de l'antigène.

A. Standardisation d'une méthode. — Les diverses Conférences internationales de Sérologie avaient pour objet de confronter des techniques : elles ont pu fournir des listes très documentées où ces techniques étaient classées par ordre de mérite. Leur but n'était pas d'établir scientifiquement une méthode-standard. Toutefois, elles ont permis à certains principes de se concrétiser en donnant naissance à une ébauche de doctrine.

Certains procédés donnent des résultats excellents quand ils sont exécutés par leurs auteurs, parce que ceux-ci possèdent *un tour de main* particulier, savent éviter les principales causes d'erreur et ont un facteur d'interprétation personnelle relativement constant.

Malheureusement, il en est parfois de ces procédés comme de certains mécanismes à rendement élevé, mais qui s'avèrent délicats à l'usage, se dérèglent facilement et réservent de tels déboires que leur emploi, en définitive, doit être rejeté.

La méthode-standard ne doit pas, nécessairement, s'être montrée la plus sensible au laboratoire de recherches ; c'est une réaction établie dans un esprit pratique et qui doit donner de bons résultats entre toutes les mains.

Il est à peine besoin de dire que nous n'avons pas en vue, ici, une sorte de vulgarisation de la sérologie. Nous nous plaçons dans les conditions de travail d'un laboratoire bien outillé, disposant d'un personnel suffisamment entraîné aux recherches courantes. Or, dans ces conditions moyennes, il est nécessaire de parvenir à la sécurité complète dans le séro-diagnostic de la syphilis.

Tout esprit quelque peu réaliste comprendra mal les préventions qui ont pu se manifester contre la publication d'une méthode-standard. Nous l'avons déjà exprimé ailleurs : il ne s'agit pas d'imposer l'usage exclusif d'un procédé, mais de fournir une technique sûre, ayant largement fait

ses preuves, et d'en décrire le mode d'utilisation avec tout le luxe de détails désirable.

Disons de suite qu'il convient, à notre sens, d'envisager le séro-diagnostic sous deux angles différents : l'expertise et la série.

a) L'expertise d'un sérum douteux, ou à Wassermann irréductible, ou paradoxal, etc., doit être pratiquée par un sérologiste de profession. Cette investigation, il la poursuit par les moyens qui lui paraissent le mieux appropriés ; elle doit faire l'objet d'un protocole complet et détaillé, suivi de conclusions précises.

b) La série correspond au travail courant. L'exécution en est confiée généralement à un personnel subalterne. Il est donc nécessaire de réduire le facteur personnel au minimum, et cette préoccupation doit dominer l'élaboration de la réaction-type.

Une telle réaction nous paraît présenter les avantages suivants :

1^o Son emploi est très répandu, ce qui donne un surcroît de garantie à son exécution correcte.

2^o Sa sensibilité et son étendue étant constantes et bien connues, la notation des résultats est intelligible à tous les praticiens. De plus, des résultats successifs, ou de provenance différente, sont comparables entre eux.

3^o Sa généralisation entraîne une expérimentation de vaste envergure qui renseigne sur sa valeur exacte et les perfectionnements qu'elle est susceptible de subir.

4^o Elle relègue à l'arrière-plan des procédés capricieux ou ayant des indications exceptionnelles, et doit entraîner, à brève échéance, la disparition des techniques médiocres.

Nous nous sommes longuement étendu, au cours de ce travail, sur les caractéristiques d'une réaction-type. Il ne peut s'agir là que d'une première approximation et, en quelque sorte, d'une introduction à l'étude rationnelle de la réaction de Wassermann. Cependant, telle qu'elle est exposée au chapitre précédent, cette réaction — de la famille des *Cal-*

mette et Massol — satisfait à la plupart des desiderata qui se dégagent, pour l'observateur attentif, de la pratique habituelle de la sérologie.

B. Standardisation de l'antigène. — La préparation de l'antigène peut être réalisée correctement, pour peu que l'on procède avec minutie et que l'on se serve de solvants chimiquement purs.

Il faut ajouter, cependant, que ces deux conditions ne sont pas d'une rencontre aussi aisée qu'elles pourraient le paraître. Pour qui n'est pas rompu à la pratique de la chimie biologique, des erreurs peuvent fort bien passer inaperçues.

Mais ce n'est pas tant la préparation proprement dite que l'*étalonnage* de l'antigène qui dépasse les possibilités des laboratoires particuliers.

Un antigène ne devrait être employé pour l'usage courant qu'à la suite d'une expérimentation offrant toute garantie quant à sa spécificité et à sa sensibilité.

Cette expérimentation ne peut qu'être de vaste envergure. Elle doit donner lieu, en parallèle avec des antigènes-étalons, à des réactions mettant en jeu non seulement des sérums syphilitiques, correspondant aux diverses périodes de la maladie, et des sérums sûrement négatifs, mais encore — et nous ne saurions trop insister sur ce point — différents sérums pathologiques.

Cette façon empirique de procéder conduit à la sélection d'antigènes donnant une grande sécurité au séro-diagnostique (1).

Répetons encore, ici, que cet antigène devrait présenter un taux de dilution fixe, afin de faire intervenir dans la réaction une concentration uniforme en alcool. Le pouvoir dissolvant de l'alcool sur les savons de l'antigène et le pouvoir relarguant du chlorure de sodium doivent, en effet, présen-

1. Si l'on admet l'hypothèse de la désintégration tissulaire, exposée dans la première partie de ce travail, on peut être amené à se demander si l'antigène n'est pas formé de plusieurs haptènes, correspondant à des phases successives de la maladie.

ter un rapport déterminé. C'est là, d'ailleurs, une condition très facilement réalisable.

Cet antigène garanti devrait être rigoureusement adapté à la réaction-standard.

L'étalonnage de l'antigène, préparé selon les méthodes actuellement en usage, ne devrait pas être le seul souci de l'Office qui en serait chargé.

Parallèlement à cette tâche pratique, cet organisme devrait poursuivre l'étude scientifique de la fraction hapténique des extraits alcooliques, et l'étude du fonctionnement physico-chimique de la réaction. Nous en arrivons ainsi à la notion d'un Institut central de Sérologie, d'une haute tenue scientifique, destiné à diriger la pratique du séro-diagnostic, tout autant qu'à assurer son constant progrès.

La sérologie s'est placée, depuis quelques années, sur le plan international.

Tout essai de médecine sociale, pour être réellement efficace, doit être pourvu d'une doctrine, non définitive certes, mais qui permet la coordination des efforts et facilite les réalisations pratiques.

Cette doctrine ne peut émaner que d'un organisme centralisateur et régulateur, muni d'une suffisante autorité.

Au cours des Conférences internationales, les doctrines de plusieurs pays s'affrontent, et de leur confrontation, appuyée sur les résultats d'une vaste expérience, résultent des ajustements profitables à tous. Mais encore faut-il y apporter autre chose qu'une opinion particulière et toute personnelle.

En cette matière, comme en beaucoup d'autres, l'improvisation est néfaste. L'élaboration d'une doctrine sérologique doit être rationnellement organisée.

Nous pensons qu'elle pourrait être conduite avec succès par un laboratoire fonctionnant en liaison étroite et constante avec la clinique, situé par conséquent au centre d'un groupe hospitalier comportant de nombreux services (syphiligraphie, médecine générale, chirurgie, maternité, etc.) et susceptible de fournir, à volonté, la plus grande variété de

sérums *rigoureusement caractérisés du point de vue clinique*. Cette dernière condition est absolument indispensable à l'expérimentation d'une technique sérologique.

Ce laboratoire devrait être, avant tout, *un authentique laboratoire de chimie-physique*, où chacun des facteurs de la réaction serait étudié par des physiciens habitués aux méthodes de la physique moderne.

La collaboration de ces spécialistes avec des vénéréologues et des sérologistes — collaboration voulue et organisée dans un but de réalisation pratique, autant que spéculatif — ne tarderait pas à mettre ordre et clarté dans ce domaine encore obscur du séro-diagnostic de la syphilis. Car, c'est en poursuivant, parallèlement à l'étude physico-chimique du sérum normal, des recherches non moins rigoureuses sur les différents sérums pathologiques — et non pas seulement syphilitiques — que l'on établira la sérologie sur des bases réellement scientifiques.

CONCLUSIONS

I. — La réaction de Bordet-Wassermann peut être considérée, avec quelque vraisemblance, comme une *réaction spécifique indirecte*. A ce titre, elle se rattacherait au principe de Bordet et appartiendrait au groupe des réactions anticorps.

- a) L'antigène de la maladie syphilitique (du point de vue sérologique) est constitué par des lipoïdes hapténiques, libérés par la désintégration pathologique des tissus (Sachs et l'Ecole d'Heidelberg). On peut émettre l'hypothèse complémentaire que ces lipoïdes pourraient provenir de la paroi des vaisseaux, plus particulièrement ;
- b) En effet, au cours de toutes les manifestations syphilitiques primaires, secondaires ou tertiaires, l'endopérivascularite est, au point de vue anatomo-pathologique, l'élément le plus constant et le plus caractéristique ;
- c) Or, les lipoïdes tissulaires sont *qualitativement* caractéristiques, *par leurs acides gras non saturés*, d'un organe déterminé, dans une même espèce zoologique (Mayer et Schaeffer, Terroine et Belin) ;
- d) Comme, d'autre part, l'organisme peut être immunisé contre les lipoïdes de ses propres organes, la mise en liberté d'haptènes spécifiques du tissu vasculaire provoquera l'apparition dans le sang d'anticorps spécifiques ;
- e) Ces anticorps pourront être décelés à l'aide de l'antigène correspondant (extrait vasculaire myocardique), en les faisant entrer dans une réaction du type Bordet-Gengou ;

f) Cette hypothèse, grâce à la notion de *spécificité chimique des tissus*, pourrait expliquer la spécificité de la réaction de Bordet-Wassermann.

II. — L'étude du mécanisme physico-chimique de la réaction, en mettant en lumière le rôle fondamental de *l'adsorption sélective*, substituée à la notion de floculation, dépourvue de spécificité, la notion plus féconde de *affinité chimique spécifique*.

- a) Le sérum sanguin n'est pas un colloïde, mais une solution moléculaire (Lecomte du Noüy). Les hautes dilutions antigéniques actuelles sont également des solutions à grosses molécules. On ne saurait donc parler de simple floculation entre colloïdes ;
- b) L'anticorps est probablement lié à la molécule globulinique, laquelle lui sert de vecteur (Wassermann). Ce fait explique que dans certaines conditions expérimentales les sérums syphilitiques puissent manifester des propriétés de surfloculance ;
- c) *L'adsorption sélective de l'haptène sur la molécule globulinique est le véritable phénomène spécifique des séro-réactions*. La floculation, quand elle se produit, est un phénomène secondaire ;
- d) Les lois mathématiques de l'hémolyse alexique témoignent, pour leur part, de l'étroit déterminisme physico-chimique de la réaction.

III. — La connaissance approfondie de la nature biologique réelle et du mécanisme de la réaction de Bordet-Wassermann doit rendre possible une standardisation rationnelle du séro-diagnostic de la syphilis.

- a) Cette standardisation devrait porter : 1^o sur une *réaction-type*, destinée à remplacer, pour l'usage courant, de trop nombreux procédés de valeur inégale ; 2^o sur l'antigène, préparé rationnellement et constitué par la fraction hapténique spécifique ;
- b) La réaction-type serait conçue dans un esprit essen-

tiellement pratique. Elle devrait réunir les caractéristiques suivantes :

- 1^o être rigoureusement spécifique, au prix même d'une moindre sensibilité ;
 - 2^o posséder une technique simple, rapide et souple ;
 - 3^o nécessiter au minimum l'intervention d'un coefficient personnel dans l'exécution aussi bien que dans la lecture des résultats ;
- c) L'antigène, préparé par un *Institut central de Sérologie*, ne serait délivré par cet organisme officiel qu'à la suite d'un contrôle sévère de sensibilité et de spécificité, effectué en présence d'un nombre suffisant de sérums syphilitiques correspondant aux différentes périodes de la maladie, de sérums négatifs et aussi de sérums pathologiques divers ;
- d) La réaction-type (munie de son antigène), à laquelle on joindrait une réaction au sérum frais et une réaction de flocculation, constituerait, avec ces dernières, le *syndrome sérologique fondamental* que tout laboratoire devrait être en mesure d'établir correctement.

Vu : le Président de la thèse,

R. DEBRÉ.

Vu : le Doyen,
ROUSSY.

Vu et permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

S. CHARLÉTY.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE.

Il ne saurait être question de donner ici la bibliographie complète se rapportant au sujet traité. On ne trouvera donc ci-après qu'un simple index des ouvrages et mémoires auxquels nous nous sommes plus particulièrement référés pour la rédaction de ce travail.

- ABADIE. — Considérations sur la valeur clinique de la réaction de Bordet-Wassermann. *Soc. de Derm. et de Syphil.*, 27 janv. 1921.
- ALLEN (J. D.). — The chemical significance of the Wassermann reaction. *Kentucky med. Journ.*, 1926, XXIV, p. 163-166.
- AMBARD. — Rôle des lipoides dans les phénomènes de l'hémolyse. *Semaine médicale*, 1908, n° 30.
- ANSEL et WANDA. — Ueber das Ergebniss der Wassermann-Reaktion innerhalb verschiedener Blutgruppen. *Zeitschr. f. Immunitätsforsch.*, XLII, 1924-1925, p. 89.
- ARRHÉNIUS (S.). — La chimie-physique dans ses rapports avec la sérothérapie. *Bull. Inst. Pasteur*, t. II, 1904, pp. 533-565.
- ANDRY et CHATELLIER. — Sérologie des prostituées à Toulouse. *Bull. Soc. franç. de Derm. et Syphil.*, janv. 1928.
- AVERY (O. T.) et GOEBEL (W. F.). — The soluble specific substance of Friedlander's bacillus. *Journ. of. exp. med.*, t. XLVI, n° 1, 1927, pp. 601-607.
- BELFANTI (S.). — Les lipoides dans l'hémolyse. C. R. I^{er} Congrès int. de Micr. Paris, 1930, t. II, 3-21, Masson.
- BELIN (P.). — Généralités de la distinction entre deux catégories de matières grasses : élément constant et élément variable. *Bull. Soc. chimie biol.*, 1926, VIII, 1081-1102.
- BERNABE FIESTAS. — La reaccion de Wassermann. *Sus causas. Revista Medica de Malaga*, Ano IX, oct. 1929, n° 61, Epoca P. 1775-1778.
- BERNARD (R.). — De l'utilité des triades de séro-réactions dans le diagnostic de la syphilis. *Bruxelles Médical*, 1927, p. 329.
- BERTRAND (G.) et THOMAS (P.). — Guide pratique des travaux de chimie biologique, Dunod et Pinat, Paris, 1913.

- BIZARD. — Le résultat de la réaction de Wassermann chez les femmes des maisons de prostituées. *Soc. de dermat. et de syph.*, 12 juillet 1928.
- BOEZ (L.). — Les théories physico-chimiques de l'immunité. *Biol. méd.*, vol. XX, 28^e année, n° 7, août-sept. 1930, pp. 231-270.
- BOGUE (R. H.). — Traité de chimie colloïdale, Hermann, 1930.
- BOJEWSKAJA et KAROL. — Intérêt pratique de la réaction de Wassermann sur le caillot sanguin (méthode de Dold). *Dermat. Wochensch.*, n° 27, juillet 1928, p. 953.
- BORDET (J.). — Le mécanisme de l'agglutination. *Ann. Inst. Pasteur*, mars 1899.
- Traité de l'immunité dans les maladies infectieuses. Masson, Paris, 1920.
- Immunité, antigènes, anticorps, in *Traité de Physiologie normale et pathologique* (publié sous la direction du professeur Roger), t. VII, Masson, Paris, 1926.
- et RUELENS. — L'antigène syphilitique de l'Institut Pasteur de Bruxelles. *C. R. Soc. Biol.*, t. LXXXII, 1919, p. 880.
- BOUTARIC (A.). — Les colloïdes et l'état colloïdal. Alcan, Paris, 1931.
- BRODEU et VAN-HOFF. — Le paludisme peut-il fausser le résultat de la séro-réaction de Wassermann? *Ann. Soc. belge de méd. des Hôp.*, t. II, n° 1. 1922, p. 4.
- BUREAU (Y.). — La carence sérologique au cours de certaines syphilis secondaires (Amédée Legrand, Paris, 1929).
- CALMETTE, BOCQUET et NÈGRE. — Manuel technique de microbiologie et sérologie. Masson, Paris, 1933.
- CARREL et INGERBRIGSTEN. — The production of antibodies by tissues living outside of the organism. *Journ. exper. med.*, t. XV, 1912.
- CARRERA (J.-L.). — Précocité élective de la réaction de Sordelli-Miravent au début de la syphilis. *Ann. mal. vén.*, 1934, p. 826-829.
- CÉSARI (E.). — Etude sur la fonction antigénique des lipoides. *Ann. Inst. Pasteur*, t. XLIV, 1930, pp. 534-542.
- CHEVREL-BODIN et CORMIER. — Identité des réactions de fixation et des réactions de floculation employées en vue du séro-diagnostic de la syphilis. *C. R. Soc. Biol.*, 16 avril 1932, p. 1153.
- Réaction de floculation avec l'antigène de Bordet-Ruelens. *C. R. Soc. Biol.*, 16 avril 1932, p. 1154.
- Préparation de l'antigène de Bordet-Ruelens en vue de la réaction de floculation. Rôle de l'électrolyte. Conditions mécaniques. *C. R. Soc. Biol.*, 21 mai 1932, p. 1153.
- CLÉMENT SIMON. — Réaction de Bordet-Wassermann. Que peut-on en attendre dans le diagnostic des manifestations syphilitiques? *Bull. Méd.*, nos 11 et 12, mars et 16 avril 1927.

- COMMANDON (J.) et DE FONTRUNE (P.). — Contribution au mécanisme de l'hémolyse. *Arch. d'Anat. microsc.*, t. XXV, 1929, 555-570.
- Complement-fixation test for syphilis. Standard procedure of American Public Health Association. *Am. J. Publ. Health*, 24, 727-731, juillet 1934.
- DEBAINS. — Sur la réaction de Bordet-Gengou. *C. R. Soc. Biol.*, 6 juin 1914.
- DELEZENNE et FOURNEAU. — Constitution du phosphatide hémolysant. *Bull. Soc. chim. de France*, 1914, t. XV, pp. 421-424.
- DEMANCHE (R.). — Le séro-diagnostic par la méthode de Bauer-Hecht. *La Clinique*, 5 nov. 1912, p. 705.
- Les réactions sérologiques de la syphilis, in *Traité de la Syphilis* de Jeanselme, t. II, Doin, Paris, 1931.
 - La fonction antigénique des lipoides et les notions nouvelles sur le mécanisme des réactions sérologiques de la syphilis. *La Presse Médicale*, n° 57, 18 juillet 1931, pp. 1077-1080.
 - Sur l'emploi des extraits cérébraux comme antigènes dans les réactions sérologiques de la syphilis, en particulier de la syphilis nerveuse. *Ann. mal. vén.*, 1932, pp. 350-353.
 - Action variée des médicaments spécifiques sur les diverses réactions sérologiques de la syphilis. *Ann. maladies vén.*, 1933, p. 32.
 - Les réagins anti-cerveau du liquide céphalo-rachidien. *Soc. Sérol. et Syphil. expér.*, 12 avril 1934.
 - Les principes directeurs de la réaction de Bordet-Wassermann. Essai de normalisation. *La Prophylaxie antivenérienne*, nov. 1935.
 - Précis de technique du séro-diagnostic de la syphilis, 2^e édit., Doin, Paris, 1936.
- DESMOULIÈRE et MERCKLEN. — La réaction de Desmoulière. Technique et interprétation clinique. *Journ. Méd. Franc.*, août 1923.
- et PARIS. — Le complément dans la réaction de Wassermann. *Paris Médical*, 18 juillet 1914.
 - L'antigène dans la réaction de Wassermann. *Acad. des Sciences*, 23 sept. 1912; 4 nov. 1912; 25 nov. 1912; 29 janv. 1913.
- DOLD (H.). — Zur Technik der Dold Reaktion. *Schweizer medizin. Wochens. Basel*, 1925, LV, p. 1118.
- und GROSS (H.). — Ueber das Ergebnis weiterer 5000 Vergleichsuntersuchungen zwischen der Wassermann Reaktion und der Dold Reaktion. *Münchener medizin. Wochenschrift*, 1926, LXXIII, n° 28, p. 1157-1159.
- DETWEILER (H.). — Survey of results of routine and other Wassermann

tests in Toronto general Hospital for past ten years. *Public Health Journal Toronto*, nov. 1926, p. 543.

DIACONO (H.). — L'hémolyse, Maloine, Paris, 1934.

DUGLAUX (J.). — Les colloïdes, Gauthier-Villars, Paris, 3^e édit., 1925.

DUJARRIC DE LA RIVIÈRE. — Bactériologie et chimie-physique. C. R. du XII^e Congrès d'hygiène, 1925, p. 1065.

— et GALLERAND. — Sur une réaction de floculation pour le diagnostic de la syphilis. C. R. Soc. Biol., 15 déc. 1923.

— GALLERAND et KOSSOVITCH. — Sur les propriétés des mélanges antigènes-teintures de résines en présence des sérums syphilitiques. C. R. Soc. Biol., 16 oct. 1926.

— Floculation des sérums en présence des mélanges antigènes-teintures de résines. Thèse de Doctorat de la Faculté des Sciences, Paris, 1929.

ECKER (E. E.). — A simple and sensitive modification of the Wassermann test. *Journ. of laborat. and Clin. med.* (Saint-Louis), 1925, 26, XI, p. 76-80.

FONTAINE. — Résultats comparatifs de la réaction de Bordet-Wassermann dans le sang du cordon, le sang de la mère et le sang de l'enfant. Thèse de la Faculté de Méd. de Paris, 1929, Louis Arnette, édit.

FORSMAN (J.). — Die Abhängigkeit der Wassermannreaktion von den Globulinen. *Biochemische Zeitschrift*, CLXXVII, 1926, nos 1-3, p. 243.

GASTOU. — Les discordances dans les résultats obtenus par les différents méthodes et procédés sérologiques dans leur rapport avec le diagnostic, le pronostic et le traitement de la syphilis. XVIII^e Congrès français de Méd., Nancy, juill. 1925.

GEORGI et FISCHER. — Au sujet de la mise en évidence d'antigènes cérébraux dans la syphilis humaine. *Klin. Woch.*, 5, 5 janv. 1931, p. 207.

GILBERT (R.) et LANGWORTHY (V.). — Standardization of the Wassermann test. *The Am. Journ. syph.*, 1926.

— Standardization of the Wassermann test. *The Amer. Journ. of syphilis*, July 1927, n^o 3.

— Standardization of the Wassermann. *The Amer. Journ. of syph.*, n^o 1, January 1929, p. 127.

GIRARD (P.) et LOURAU (M.). — Premiers renseignements sur la nature et les propriétés physiques d'un anticorps : électrophorèse des sérums hémolytiques. C. R. Acad. des Sciences, 12 mars 1934.

GOUGEROT. — Valeur diagnostique de la séro-réaction de Bordet-Wassermann. *Paris Médical*, n^o 23, 8 juin 1929, p. 352.

- GOUGEROT et PEYRE. — Valeur diagnostique de la réaction de Desmoulière. *Ann. mal. vén.*, avril 1925.
- Mécanisme de la fonction anti-complémentaire d'un sérum. Soc. franç. de sérologie appliquée, mars 1932.
- GOUGEROT et RAGU. — Bordet-Wassermann irréductibles. Augmentation du cholestérol sanguin. Parallélisme des courbes du Bordet-Wassermann et du cholestérol. Soc. dermat. de Paris, 15 janv. 1931.
- Great Britain Ministry of Health. — On serological tests for syphilis with very small amounts of patient's serum, 1934.
- GREVAL (S.). — A simple method of standardizing the red cell suspension in connection with the Wassermann reaction. *The Indian Medic. Gazette*, vol. LXIV, n° 12, déc. 1929, p. 573.
- HALBER (W.) und HIRSZFELD (L.). — Ueber Antikörper gegen zirkulations-eigene Lipoide und ihre Beziehung zur Wassermannscher Reaktion. *Zeits. f. Immunol.*, XLVIII, 1926, n° 1, p. 69-78.
- HECHT und SCHUBERT. — Ueber das Zustandekommen der syphilitischen Blutveränderung. *Deut. med. Woch.*, 1925, p. 2151.
- HECHT. — Une simplification de la méthode de la fixation du complément dans la syphilis. *Wiener Klinische Woch.*, 1908.
- Une simplification de la réaction de fixation du complément dans syphilis. *Wien. Klin. Wochens.*, 1909, t. XXI, n° 10, p. 338.
- HEIMANN. — Ueber die Konkurrenz von Antigenwirkungen bei der Immunisierung mit Lipoiden. *Zeitsch. f. Immunität. u. exp. Therap.*, LIII, 1927.
- HEINSHEIMER. — Ueber die Unabhängigkeit von Lipoide und Eiweissantikörpern in den durch die Kombinations-Methode erhaltenen Immunseris. *Zeitsch. f. Immunit. u. exp. Th.*, XLVIII, 1926.
- HILGERS (W. E.) et KOTZINK (K.). — Serologische Luesdiagnose im Dunkelfeldmikroskop. *Medis. Klinik* (Berlin), 1925, XXI, p. 1618.
- HILGERS (W. E.) et WOHLFEIL (T.). — Die Bedeutung des Resistenzquotienten der Hammelbluterythrozyten für die Technik der Wassermann Reaktion. *Zeitschr. f. Immunitätsforschung. g.* (Iena), 1926, XLVI, p. 504-524.
- HILPERT und KLOPSTOCK. — Die Bedeutung der gleichzeitigen Ausführung mehrerer Methoden für den serologischen Luesnachweis. *Klin. Woch.*, 1926, p. 265.
- HINKLEMAN OKLAHOMA. — The biochemistry of the Wassermann reaction. *Amer. journ. of syphilis*, oct. 27, n° 4, p. 594.
- HOTTA (K.). — Ueber die Verwendbarkeit von Benzochol-Extrakten zur Wassermannschen Reaktion. *Zeitschr. f. Immunitätsforschung* (Iena), 1925, XLV, 442.

- JAUBERT. — Nouvel antigène pour le séro-diagnostic de la syphilis. C.-R., Soc. Biol., 11 avril 1924.
- JAUSION et PECKER (A.). — Réduction paradoxale d'un Bordet-Wassermann résistant depuis 12 ans. Soc. franç. de sérol. appl., mars 1932.
- JEANSELME et BLOCH. — Réaction de Bordet-Wassermann (interprétation actuelle des résultats). *Bull. Méd.*, 27 sept. 1919.
- KINKLEMAN (J. A.) — Treponema pallida antigens in the Wassermans reaction. *American Journal of syphilis* (St-Louis), 1925, IX, p. 181, 1926, X, p. 338).
- KLOPSTOCK (A.). — Zur Kenntniss der konkurrenz von Lipoidantigenen. *Zeit. f. Immun. u. exp. Th.*, LV, 1928.
- Die Methoden zur sero-diagnostik der syphilis, 1933.
- und HILPERT. — Die Bedeutung der gleichzeitigen Ausführung mehrerer Methoden für den serologischen Luesnachweis. *Klin. Wochens.*, 1926, p. 265.
- KISS (J.). — Die Vereinfachung der Luesreaktionen I. — Darstellung der Antigene für die Wassermannsche Reaktion. *Zeitschr. f. Immunitätsforschung* (Iena), 1925, XLIV, p. 466-486.
- KOPACZEWSKI (W.). — Introduction à l'étude des colloïdes. Gauthier-Villars, Paris, 1926.
- LANDSTEINER. — Biochem. Zeitsch., CXI, 1921.
- LATAPIE. — Séro-diagnostic de la syphilis. Procédé simplifié de préparation de l'antigène. C. R. Soc. Biol., t. LXXX, 3 mars 1917, p. 270.
- LAUBRY et PARVU. — La réaction de Wassermann au cours de quelques affections cardio-vasculaires. C. R. Soc. Biol., juillet 1909.
- LAURENTIER (Ch.). — Au sujet des syphilis évolutives à sérologie muette. Soc. de Derm. de Paris, 15 janv. 1931.
- LASSEUR et SPILLMANN. — Réactions anticorps. Paris, 1921.
- LECOMTE DU NOÛY (P.). — Annales de l'Institut Pasteur, t. 42, 1928 ; 43, 1929 ; 44, 1930 ; 45, 1930 ; 48, 1932 ; 49, 1932 ; 50, 1933.
- La sérologie à la lumière des données nouvelles sur les propriétés physico-chimiques des sérums. *Ann. malad. vénér.*, 1933, pp. 181-196.
- et SEELICH. — Annales de l'Institut Pasteur, t. 52, 1934, p. 540.
- LEMELAND (P.). — Recherches chimiques et physiologiques sur le dosage des lipoides. *Bull. Soc. chimie biol.*, 1921, III, 134, 1922.
- Méthode de dosage des acides gras et de l'insaponifiable dans les tissus et humeurs de l'organisme. C. R. Soc. Biol., 1922, t. LXXXVII, 500.
- LERREDE et RUBINSTEIN. — Standardisation de la réaction de Bordet-Wassermann. *La Presse Médicale*, 1920, n° 45.

- LETULLE (R.). — La technique de Calmette et Massol pour la réaction de Bordet-Wassermann. *La Presse Médicale*, 25 août 1920.
- LEVADITI. — La syphilis, expérimentation, microbiologie, diagnostic. Masson, Paris.
- LÉVY (G.). — Le séro-diagnostic de la syphilis. *Pratique Médicale Française*, août 1930.
- Considérations sur la réaction de Hecht. *Ann. mal. vén.*, 1932, pp. 742-771.
- Comparaison entre la méthode de Kahn et une méthode personnelle. *Ann. mal. vén.*, 1933, pp. 501-504.
- LOEB (J.). — Les protéines. Alcan, Paris, 1924.
- La théorie des phénomènes colloïdaux. Alcan, Paris, 1925.
- LOPEZ-RUIZ. — Etude sur la réaction de Desmoulière. Thèse Méd. Paris, 1933.
- MACHEBOEUF (M.). — Recherches sur les lipides. Laval, 1928.
- et SANDOR (G.). — Etude de l'extraction des lipides du sérum sanguin par l'éther en présence d'alcool. C. R. Ac. Sciences, 21 mars 1932.
- MARGOSCHES. — Die Jodzahl-schnellmethode und die Überjodzähl der Fette. Stuttgart, 1927.
- MAYER et SCHAEFFER. — Recherches sur la teneur des tissus en lipoides. *Journ. Physiol. et Path. génér.*, 1913, XV, 511-524, 534-548 ; 1914, XVI, 1-16, 23, 28.
- MEINICKE. — Neuere Ergebnisse der Serodiagnostik der Syphilis. *Dermat. Zeitschr.*, XLIV, 1925, p. 49.
- Sérologie moderne de la syphilis. *Ann. de l'Institut. Pasteur*, oct. 1926, n° 10, p. 876.
- MILIAN. — Valeur pratique de la réaction de Bordet-Wassermann. *Paris Médical*, n° 20, 14 mai 1927.
- MLADEN PAIC. — Spectre d'absorption dans l'ultraviolet des sérums des syphilitiques. *Ann. mal. vén.*, 1934, p. 672.
- MURDOCK HALL. — An analysis of twenty-five hundred blood Wassermann reactions. *The Amer. Journ of syph.*, Saint-Louis, janvier 1930, p. 107.
- MUTERMILCH. — A propos de la circulaire ministérielle du 27 mars 1920 sur la pratique de la réaction de Wassermann en Allemagne. *Revue d'Hyg. et de police sanit.*, avril 1922, p. 333.
- La Société des Nations et le problème de la standardisation du séro-diagnostic de la syphilis. *La Presse Médicale*, 13 août 1924.
- L'application des réactions d'opacification au séro-diagnostic de la syphilis. *La Presse Méd.*, 1^{er} sept. 1926, p. 1107.
- et LATAPIE. — Sur une simplification du procédé dit rapide pour

- le séro-diagnostic de la syphilis. C. R. Soc. Biol., t. LXXXVI, avril 1922, p. 748.
- NICOLAS et GATÉ. — La réaction de Wassermann du sang. Sa valeur théorique, sa valeur pratique, ses méfaits. *Ann. de Derm. et de Syph.*, n° 3, p. 1923.
- Clinique et réaction de Wassermann. *Le Bulletin Médical*, 18 janvier 1930, n° 3, p. 43.
- NICOLLE (M.). — Conception générale des anticorps. C. R. Soc. Biol., juillet 1907.
- NOGUCHI. — Procédé nouveau et simple pour le séro-diagnostic de la syphilis. *Journ. of. Exp. Med.*, t. XI, fasc. 2, 1909, p. 392.
- OGLIASTRI. — Contribution à l'étude des Wassermann oscillants. Thèse 1929, Jouve et Cie, édit., Paris.
- OSATO (S.) et HEKI (M.). — Microdosage des lipides dans les tissus. *Journ. biol. chem.*, 87, 1930, p. 541.
- PEYRE (E.). — Intérêt de la méthode des dilutions dans la réaction de Bordet-Wassermann. *La Presse Médicale*, 19 janvier 1921.
- Dispositions colloïdales particulières aux sérums des syphilitiques et aux sérums dits anticomplémentaires. C. R. Soc. Biol., 19 mars 1921, p. 536.
- Manuel de sérologie pratique. Alcan, Paris, 1935.
- PLANQUE (R. M.). — Le diagnostic de la syphilis par la réaction au sérum frais. Méthode de saturation. Thèse de Lille, 1926, 48 p.
- RAVELO (A.). — Séro-diagnostic de la syphilis. Thèse Méd., Paris, 1935.
- RENAUD (M.). — Principes sérologiques pour une théorie des réactions basées sur la déviation du complément. C. R. Soc. Biol., 28 mars 1924.
- RODILLON (G.). — La réaction de Wassermann. Maloine, Paris, 1926.
- RONCHÈSE. — La réaction de Bordet-Wassermann pour le séro-diagnostic de la syphilis. Masson, Paris, 1919.
- Procédé de conservation de l'activité du complément. C. R. Soc. Biol., t. LXXXII, 1^{er} mars 1919, p. 193.
- Sur l'appréciation numérique de l'intensité de la réaction de Wassermann. C. R. Soc. Biol., t. LXXXIII, janv. 1920, p. 18.
- RUBINSTEIN. — Séro-diagnostic de la syphilis. Sérum de Porc dans la réaction de Wassermann. C. R. Soc. Biol., t. LXXXI, 26 oct. 1918, p. 916.
- Réaction de fixation. C. R. Soc. Biol., t. LXXXII, 10 mai 1919, p. 463.
- Séro-diagnostic de la syphilis (Wassermann, Hecht, Jacobsthal), technique et interprétation. *Paris Médical*, 7 mars 1925.
- L'état actuel des méthodes employées pour le diagnostic de la syphilis. *Presse Médicale*, 2 fév. 1927, n° 10.

- Traité pratique de sérologie et de séro-diagnostic, Maloine, Paris, 1932.
- RUBINSTEIN et RADOSSAVLIEVITCH. — Séro-diagnostic de la syphilis. Saturation du pouvoir hémolytique des sérums. C. R. Soc. Biol., t. LXXXII, 5 avril, 24 mai 1919, p. 361 et 526.
- Séro-diagnostic de la syphilis. Les erreurs de technique dans la réaction de Hecht et leurs causes. *La Presse Médicale*, 7 juillet 1919.
- SACHS (H.). — Probleme der Serodiagnostik. *Jahreskurse f. Arztliche Fortbildung* (München), 1925, XVI, Heft 10, 1-20.
- Sérologische Funktionen der Lipoide. *Berichte üb. die gesamte Phys.*, XLII, 1927.
- Ueber die serologische Reaktionsbereitschaft der Lipoide im Organismus. *Arch. f. Verda.*, XLII, 1928.
- Probleme der pathologischen Physiologie im Lichte neuerer immunbiologischer Betrachtung. *Wien. Klin. Woch.*, H. 13, 1928.
- et BOCK (G.). — Zur Kenntnis der Beziehungen zwischen Antigenstruktur und Antigenfunktion bei Lipoiden. *Arb. aus dem Staats-Institut f. exp. Therap. zu Frankfurt A. M.*, 21, 1928.
- KLOPSTOCK (A.), WEIL (A. J.). — Deutsche med. Woch., 15 et 25, 1925.
- SCHAFER (L. W.). — The use and abuse of the Wassermann reaction. *American Journ. Syph.*, XI, 1926, p. 651.
- SCHUBERT und HECHT. — Ueber das Zustandekommen der syphilitischen Blutveränderung. *Deut. Med. Woch.*, 1925, p. 2151.
- SELTNER (E.). — Ueber das Verhalten der Lipoidantikörper bei Fraktionierung des Serums durch Säurefällung. *Zeitsch. f. Imm. u. exp. Therap.*, LV, 2, 1928.
- SÉZARY (J.), PERNET et GALLERAND (L.). — Les poussées temporaires de la réaction de Bordet-Wassermann dans la syphilis tardive. *Presse Méd.*, 2 juillet 1927.
- SIMEONS (A.). — Beitrag zur Natur der Erweisskomponente bei der Antikörperbildung durch Lipoide. *Zeitsch. f. Imm. u. exp. Ther.*, LI, 1927.
- TERROINE (E. F.) et BELIN (P.). — L'élément constant des lipides : ses caractères. *Bull. Soc. Chimie biol.*, 9, 1927, pp. 12-47.
- THIOLAT (P.). — Recherche d'un test sérologique pour apprécier la valeur des médicaments antisypilitiques. Thèse de Paris, 1926.
- TRIBONDEAU. — Une variation du procédé de Hecht pour la réaction de Wassermann. C. R. Soc. biol., t. LXXX, 16 juin 1917, p. 681.
- Tsü (Sien Yung). — Une nouvelle méthode de diagnostic de la syphilis avec le sérum actif. *Klin. Woch.*, 15 janv. 1928, n° 3, p. 119.
- VALLET (G.). — Les procédés dérivés de la technique de Calmette et Mas-

sol pour la réaction de Wassermann. *La Presse médicale*, 30 octobre 1920.

VAURS (R.). — Considérations sur la pratique actuelle du diagnostic sérologique de la syphilis. *Le Progrès médical*, 24 février 1934.

VERNES (A.). — Les signes humoraux de la syphilis. Th. Méd. Paris, 1913.

— De la mesure colorimétrique de l'infection syphilitique. C. R. Ac. des Sciences, 2 sept. 1918.

VLÈS (F.). — Précis de chimie-physique. Vigot, Paris, 1929.

WASSERMANN. — Sur le séro-diagnostic de la syphilis. *Wien. Klin. Woch.*, n° 12, 19 mars 1908, p. 388.

— A propos de l'histoire du séro-diagnostic de la syphilis. *Berl. Klin. Woch.*, 30 oct. 1924, p. 1194.

WEIL (A. J.). — Ueber den Nachweis von Antigenfunktionen der Lipoide im Blutserum. *Zeitsch. f. Imm. u. exp. Ther.*, XLVIII, 1926.

WILMANN (K.) und STEINER (G.). — Syphilis und Metasyphilis. *Zeitsch. f. d. ges. Neurol. und Psych.*, CI, 1926, p. 875-916.

WITEBSKY (E.). — Ueber die Antigenfunktion der alkoholischen Bestandteile menschlicher Blutkörperchen verschiedener Gruppen. *Zeitsch. f. Imm. u. exp. Ther.*, XLVIII, 1927; XLIV, 1927.

— Ueber die Verteilung heterogentischer Lipoidantigene im Organismus und die Beeinflussung ihrer immunisatorischen Funktion durch andere Antigene höherer Spezificität. *Zeitsch. f. Imm. u. exp. Ther.*, LI, 1927.

— Betrachtungen zur Pathogenese metasyphilitischer Erkrankungen. *München. med. Woch.*, 45, 1927.

— Disponibilität und Spezificität alkoholischer Strukturen von Organen und bösartigen Geschwülsten. *Habilitationssch. z. Erlang. d. Venia*. Heidelberg, 1929.

ZSIGMONDY. — Traité de chimie colloïdale. Dunod, Paris, 1926.

TABLE DES MATIÈRES

	Pages
AVANT-PROPOS.....	9

PREMIÈRE PARTIE

LA SPÉCIFICITÉ DE LA RÉACTION DE BORDET-WASSERMANN

CHAPITRE I. — L'immunité et le séro-diagnostic de la syphilis.....	14
La défense des organismes vivants et l'état de maladie.....	15
Le principe de Bordet et Gengou.....	17
La réaction de Wassermann.....	19
La fonction haptène.....	21
Nature du séro-diagnostic de la syphilis.....	24
CHAPITRE II. — L'antigène spécifique.....	30
Polyvalence et spécificité hapténique d'un antigène.....	30
Principaux types d'extraits antigéniques.....	32
Les lipoïdes.....	36
Lipoïdes tissulaires et spécificité d'organe.....	40
Extraction des lipoides tissulaires.....	43
Constitution des antigènes syphilitiques.....	51

SECONDE PARTIE

LES FACTEURS PHYSICO-CHIMIQUES DE LA RÉACTION DE BORDET-WASSERMANN

CHAPITRE I. — L'adsorption sélective.....	53
Les théories.....	54
Les interactions entre colloïdes.....	57
Les lois de l'adsorption.....	61
Adsorption, affinité chimique et réactions anticorps.....	65
CHAPITRE II. — Le test hémolytique.....	78
L'hématie et la diffusion de l'hémoglobine.....	79
L'hémolyse biologique.....	82
Alexine et sensibilisatrice globulaires.....	84
Lois physico-chimiques de l'hémolyse alexique.....	93

TROISIÈME PARTIE

LA STANDARDISATION DES RÉACTIONS D'HÉMOLYSE

CHAPITRE I. — La réaction-type.....	98
Principes généraux.....	98
Réglage du test hémolytique.....	107
La réaction-type.....	112
CHAPITRE II. — La pratique du séro-diagnostic de la syphilis.....	131
D'une doctrine sérologique.....	131
La standardisation du séro-diagnostic.....	147
CONCLUSIONS.....	154
BIBLIOGRAPHIE.....	157